

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



TESIS DOCTORAL

**Determinación de residuos farmacéuticos en alimentos y
muestras medioambientales: Evaluación de su toxicidad con
larvas de pez cebra**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Noemí Molina Fernández

Directores

**Concepción Pérez Conde
Jon Sanz Landaluze**

Madrid

© Noemí Molina Fernández, 2019



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

DETERMINACIÓN DE RESIDUOS FARMACÉUTICOS EN ALIMENTOS Y MUESTRAS MEDIOAMBIENTALES. EVALUACIÓN DE SU TOXICIDAD CON LARVAS DE PEZ CEBRA.

TESIS DOCTORAL

Noemí Molina Fernández

Directores:

Concepción Pérez Conde

Jon Sanz Landaluze



Madrid, 2019



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS
PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

D./Dña. NOEMI MOLINA FERNÁNDEZ,
estudiante en el Programa de Doctorado QUÍMICA AVANZADA RD 99/2011,
de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de
Madrid, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y
titulada:

DETERMINACIÓN DE RESIDUOS FARMACÉUTICOS EN ALIMENTOS Y MUESTRAS
MEDIOAMBIENTALES. EVALUACIÓN DE SU TOXICIDAD CON LARVAS DE PEZ ZEBRA.

y dirigida por: CONCEPCIÓN PÉREZ CONDE Y JON SANZ LANDALUZE

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Madrid, a 10 de julio de 2019

Fdo.: NOEMI MOLINA FERNÁNDEZ

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS



TESIS DOCTORAL

“Determinación de residuos farmacéuticos en alimentos y muestras medioambientales: Evaluación de su toxicidad con larvas de pez cebra”

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Noemi Molina Fernández

Directores

Concepción Pérez Conde

Jon Sanz Landaluze

Dña. CONCEPCIÓN PÉREZ CONDE, PROFESORA TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,

D. JON SANZ LANDALUZE, PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,

HACEN CONSTAR QUE:

El presente trabajo, titulado “**Determinación de residuos farmacéuticos en alimentos y muestras medioambientales: Evaluación de su toxicidad con larvas de pez zebra**” ha sido realizado bajo nuestra supervisión por la Licenciada Noemi Molina Fernández, constituyendo la Tesis Doctoral de su autora.

Madrid, a 03 de Septiembre de 2019,

Fdo: Dra. Concepción Pérez Conde

Fdo: Dr. Jon Sanz Landaluze

La elaboración de la presente Tesis Doctoral ha sido posible gracias a la concesión de una beca para la formación de profesorado universitario, FPU (AP2010-0740) dentro del programa estatal de promoción del talento y su empleabilidad del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte.

El presente trabajo se ha llevado a cabo en el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid (UCM) dentro de las líneas de investigación del *Grupo de Investigación Determinación de Trazas, Especiación y Proteómica (TrEP)* dentro de los proyectos de investigación:

- Proyecto CTQ2014-54801-C2-1-R (Ministerio de Economía y Competitividad)
- Proyecto AVANSECAL (S2013/ABI-3028)

Todas las muestras para los diferentes ensayos de bioacumulación fueron suministradas por AZTI Tecnalia (Parque Tecnológico de Bizkaia (Drio-Bizkaia)).

Agradecimientos

Y por fin llegó el momento. Un camino duro, repleto de dudas, miedos, derrotas, alegrías y éxitos. Un camino largo que me ha permitido ampliar conocimientos y superar momentos que merecen la pena recordar. En estas líneas me gustaría mostrar mi agradecimiento a todas las personas que han formado parte de todo este período y que de una manera u otra han contribuido a enriquecer esta tesis, no solo a nivel científico, sino a nivel personal ya que gracias a ellas hemos podido llegar hasta aquí y terminar esta etapa.

En primer lugar, agradezco a la Profesora Carmen Cámara la oportunidad que me dio al permitir incorporarme a su grupo de investigación. No solo me brindó su apoyo a nivel científico sino que, además, me ayudó a superar numerosos temas personales que se cruzaron por el camino. Su disciplina, su conocimiento y sus propósitos me ayudaron a superar y conseguir muchos logros. Por extensión, al grupo de la Profesora Carmen Cámara y al departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias Químicas, así

como a M^a Antonia Palacios y Mari Cruz Moreno Bondi como directoras del departamento.

A mis directores de tesis quiero darles un agradecimiento especial, la Doctora Concepción Pérez Conde y el Doctor Jon Sanz Landaluze. Desde el trabajo fin de licenciatura hasta la tesis doctoral, consiguieron darme la seguridad y confianza necesaria para iniciar mi andadura en la investigación y meterme en el mundo de la cromatografía, lo que me ha permitido abrir muchas puertas a nivel laboral y continuar dedicándome al mundo de los fármacos. Gracias Conchita por haberte sentado a mi lado en numerosas ocasiones, por escucharme infinitas veces y por darme la tranquilidad y confianza en mi misma que, en ocasiones, he perdido y me ha costado encontrar. Y gracias por ayudarme en el ámbito personal que tantas y tantas veces he necesitado. La vida es dura a veces y cuesta esquivar las piedras que nos encontramos en el camino. Gracias Jon, por estar siempre ahí y recibir tu ayuda siempre que he recurrido a ti, a cualquier hora y en cualquier momento, incluso sin estar en la Facultad. No olvidaré todos los momentos personales que hemos pasado juntos. Lo bueno es lo que perdura siempre.

Y la tesis no tendría sentido sin nombrar a las personas que han compartido horas y horas a mi lado... Risas, congresos, desayunos, cenas y muchos otros momentos vividos. Por eso, a todos ellos, mi agradecimiento en esta tesis. A María Sánchez, aunque estemos alejadas desde que terminamos el doctorado y hayamos elegido caminos diferentes, siempre estarás presente en mí. Gran amiga, con letras mayúsculas, ayudándonos de forma incondicional, riéndonos, agobiándonos juntas y compartiendo momentos únicos que siempre tendré en mi recuerdo... María Palomo, otro pilar que he tenido en estos años de andadura y con la que he compartido momentos inolvidables y agobios importantes. A Ire, mi rubia, gracias por estar ahí... acompañándonos en los buenos y malos momentos. A Mabel, mi Mabel... Qué bonita eres y qué gran amiga me llevo contigo. No cambies nunca porque tienes un corazón de oro y eres estupenda. A Sandri, mi Sandri... Últimos años de doctorado juntas y gran descubrimiento. Eres increíble, gran profesional y una persona estupenda. Personas como tú son las que valen la pena. Y cómo no mencionar a mi Danielita... Brasil está lejos pero siempre tendré pendiente el ir a verte. Iré. Llegaste al grupo para una estancia y tras meses compartiendo momentos juntas, me encuentro despidiéndome de ti, llorando las dos a mares. Siempre estarás en mi corazón y aquí me tienes para lo que necesites. A José Luis Luque, otro amigo que me

llevo con un corazón enorme. Siempre me has valorado y has sabido hacerme entender lo que cuesta un doctorado y ver lo bonito de todo. Cuántas conversaciones hemos tenido y qué cariño te he cogido. Por un millón de euros volvería a repetir todo sin pensarlo... ¡jjjjajajaja!!! A Teresa, no solo tu función de “profe” me ha ayudado con esta tesis sino tu amistad, tu cariño hacia mi y nuestros mensajes y nuestras conversaciones son las que han hecho que seas una de las personas que me lleve guardaditas con un lacito en mi bolsito de amigos. Tus mensajitos de “¿Cómo estás? ¿Cómo va la tesis?” reflejan la amistad que hemos construido en estos años. Gracias, de verdad, por todo lo que me has ayudado. Sin duda, el doctorado, une.

A Raquel, tu carácter y conocimientos han hecho que crezca y me enamore la investigación. Muchas gracias por todo lo que me has enseñado y por todas nuestras conversaciones. A las nuevas incorporaciones: Gus, Bea... convivimos poquito tiempo pero el justo para saber que sois personas increíbles. Aún hoy, nos seguimos escribiendo y dándonos ánimos. Sois geniales. A Pablo, Sonia, Laura, Mari, Héctor, Estefanía... Gracias por compartir momentos y hacer más llevaderas las horas del laboratorio.

No puedo olvidarme de los químicos (Vicente, Jacobo y Diego) y Nacho, el inorgánico. Gracias por todos los momentos, risas y comentarios buenos que nos habéis hecho siempre. Da gusto estar a vuestro lado.

A mis amigas del cole, Pati, Sara, Meri... El 2018 me trajo momentos buenos pero, sin duda, nuestro reencuentro fue una de las mejores cosas que me ha dado la vida. No os vayáis nunca de mi lado, os necesito y, aunque nuestros trabajos y nuestro papel de mamis nos hagan estar un poquito más alejadas de como quisiéramos, nuestra amistad perdurará eternamente.

A mis amigos del Pasteur: Rafa, Juani, Jose, Nuri, David, Gema, Luis y Betty. Otro gran descubrimiento de hace tres años. Muchas gracias por estar siempre ahí y darme la fuerza necesaria para lograr acabar esta tesis. Sin vuestras palabras de ánimo y la promesa del “Seven”, no hubiera sido lo mismo.

A Desi. Mi gran amiga, mi confidente, mi pilar, la persona que siempre está cuando la necesito. Mil gracias por todo lo que hemos vivido juntas y por todo lo que nos queda por vivir. De las cosas más bonitas que me ha dado la carrera.

A mis amigas de Villarta: Tani, Carol, Marisol, Fany... Qué hubiera sido de mi sin esas conversaciones durante horas, esas risas y sin esa organización de despedida de soltera mientras escribía esta tesis. Gracias por darme la fuerza necesaria para llegar hasta aquí. Ha sido duro pero, por fin, llegó. No llegáis a saber lo que vuestras palabras de aliento me han ayudado. Ahora nos quedan muchos momentos que seguir disfrutando y muchas, muchas risas. No perdáis vuestra esencia.

Gracias de corazón a mi familia. Su apoyo incondicional y su confianza en mí han hecho posible todo esto. A mis tíos y primos... A mi prima Sonia, porque su paciencia infinita y sus veranos a mi lado, han dado sus frutos. Al final, el serrín de cada verano, los cuadernos Santillana y las regañinas y enfados para que yo entendiese que me enseñabas a crecer, entre otras muchas cosas, han sido parte de la materia prima que ha labrado mi futuro. Gracias por contribuir a que esto llegue a su fin.

A mi hermano Cristian, mi otra mitad. Gracias por ayudarme “a tu manera” (¡¡¡jajajajaja!!!) a lograr todo lo que me propongo. Tu corazón y tu carácter hacen que te quiera a rabiar. Tienes una luz increíble, no cambies nunca. Tú, en tu totalidad, haces que quiera protegerte, ayudarte y quererte. Todos mis logros son tuyos y los tuyos, míos. Siempre juntos.

En especial, a mis padres, José y Esperanza. Sin duda, los responsables directos de esto y de que haya llegado hasta aquí. No tengo manera de agradecerlos todo lo que habéis hecho por mí en todos estos años y todo lo que seguís haciendo. Os necesito a mi lado y conmigo y ahora tengo una personita junto a mí, llamada Neizan, que os necesita aún más, si cabe. Gracias infinitas por haberme dado todo el apoyo, la confianza, el cariño, la fuerza, el coraje y la templanza que he necesitado en todo este tiempo. Sin saberlo, habéis sido el espejo en el que me he reflejado para coger la fuerza que, en ocasiones, me ha faltado y que me servirá, sin duda, para llegar a ser el espejo futuro de mis hijos de la misma manera que vosotros lo habéis sido para mí. La vida nos ha puesto muchas piedras en el camino pero también, gracias a la vida, seguimos juntos y de la mano.

Superaremos todo lo que nos venga, como hasta ahora. Sin miedo. Esto es por vosotros y para vosotros.

Otra de mis menciones especiales es a mi marido, Carlos. Hace 17 años decidimos comenzar nuestra andadura juntos. Sin saberlo, nos convertimos en las piezas de puzzle que encajan a la perfección y eres la persona que me conoce, me cuida y me ayuda a crecer en todos los aspectos. Eres, sin duda, el responsable de que haya podido dedicar las horas que ha necesitado la elaboración de esta tesis, dejándome que me desentendiera de nuestra vida diaria y haciendo de “papi” y “mami” en todo este tiempo. Gracias infinitas por tu apoyo diario, por tu dedicación, por tu paciencia, por tus comentarios de ánimo, por tu saber estar, tanto en mis momentos buenos como en los malos y por ayudarme a ver siempre mis capacidades y ver todo lo bueno y positivo de mí que, en ocasiones, me cuesta ver. En definitiva, gracias por quererme así. Sin duda, eres un pedacito de esta tesis. CKN siempre.

Por último, a mi hijo Neizan. Sin ni siquiera llegar a escribir una sola palabra de este párrafo, pienso en ti y me emociono. Has sido el que más ha sufrido mi ausencia en todo este tiempo. Comenzaste en mi barriga, escuchando el ruido tan insoportable que provocaba la sonda de ultrasonidos en el laboratorio, llamaste a la puerta mientras comenzaba a pelearme con el mundo de los antidepresivos en el equipo de fluorescencia y estás junto a mí para finalizar esta última etapa. La fuerza que me has dado en todo este tiempo, tu paciencia infinita por no tener a “mami” al lado para cenar, dormir o hacer los deberes, tu ausencia de preguntas cuando he estado tan dedicada a esto y tus abrazos y besos espontáneos mientras yo escribía, ha sido mi mayor empuje. Sin saberlo, has sido protagonista de esta historia y seguirás siéndolo de los siguientes episodios que escribamos juntos. Me emociona saber que todo esto ha sido siempre pensando en ti, por ti y para ti. “Te quiero hasta la luna y las estrellas”. Siempre.

Para ti.

**"Enseñarás a volar, enseñarás a
soñar, enseñarás a vivir...**

**En cada vuelo, en cada vida, en
cada sueño, perdurará siempre la
huella del camino enseñado".**

Determinación de residuos farmacéuticos en alimentos y muestras medioambientales. Evaluación de su toxicidad con larvas de pez cebra.

Índice

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Índice de tablas	6
Índice de figuras	10
Abreviaturas	14
RESUMEN	19
SUMMARY	25
Capítulo I. INTRODUCCIÓN	31
I.1. CONTAMINANTES EMERGENTES	32
I.2. FÁRMACOS DE INTERÉS.....	37
I.2.1. Reguladores lipídicos	37
I.2.1.a. Definición y usos	37
I.2.1.b. Estructura y propiedades físico-químicas	39
I.2.2. Antiinflamatorios no esteroides (NSAIDs)	39
I.2.2.a. Definición y usos	39
I.2.2.b. Estructura y propiedades físico-químicas	41
I.2.3. Antidepresivos inhibidores de la recaptación de serotonina (SSRIs)	43
I.2.3.a. Definición y usos	43
I.2.3.b. Estructura y propiedades físico-químicas	45
I.3. DISTRIBUCIÓN DE RESIDUOS FARMACÉUTICOS EN EL MEDIO AMBIENTE .	47
I.4. NORMATIVA REACH	49
I.5. BIOACUMULACIÓN / BIOCONCENTRACIÓN	52
I.6. GUÍA OCDE 305: BIOCONCENTRACIÓN EN PECES ADULTOS	58
I.7. PEZ CEBRA	61
I.8. MÉTODO ALTERNATIVO DEL ESTUDIO DE BIOACUMULACIÓN CON LARVAS DE PEZ CEBRA	64
I.9. METODOLOGÍAS ANALÍTICAS	66
Capítulo II. OBJETIVOS	73
Capítulo III. DETERMINACIÓN DE NSAIDs Y ÁCIDO CLOFÍBRICO EN MUESTRAS MEDIOAMBIENTALES Y ALIMENTARIAS. EVALUACIÓN DEL FACTOR DE BIOACUMULACIÓN EN LARVAS DE PEZ CEBRA	79
III.1. INSTRUMENTACIÓN, REACTIVOS Y MUESTRAS	83

III.1.1. Instrumentación	83
III.1.2. Reactivos	84
III.1.3. Preparación de las muestras: huevos de lumpo y experimentos de bioacumulación con larvas de pez cebra	85
III.2. METODOLOGÍA ANALÍTICA	88
III.2.1. Medios de cultivo.....	88
III.2.2. Huevas de lumpo	88
III.2.3. Larvas de pez cebra	89
III.2.4. Validación de los métodos analíticos desarrollados	90
III.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	92
III.3.1. Optimización de la separación cromatográfica	92
III.3.2. Optimización de las condiciones de derivatización	95
III.3.3. Larvas de pez cebra	99
III.3.3.1. Medios de cultivo	100
III.3.3.2. Huevas de lumpo	101
III.3.3.3. Larvas de pez cebra	103
III.3.4. Validación del método analítico propuesto	104
III.3.5. Ensayos de bioacumulación	108
III.3.5.1. Medios de cultivo	108
III.3.5.2. Larvas de pez cebra	109
III.3.5.3. Factores de bioacumulación	111
Capítulo IV. DETERMINACIÓN DE SSRI Y SUS METABOLITOS EN MUESTRAS MEDIOAMBIENTALES Y ALIMENTARIAS. EVALUACIÓN DEL POTENCIAL DE BIOACUMULACIÓN EN LARVAS DE PEZ CEBRA	117
IV.1. INSTRUMENTACIÓN, REACTIVOS Y MUESTRAS	121
IV.1.1. Instrumentación	121
IV.1.2. Reactivos y soluciones estándar	122
IV.1.3. Muestras y experimentos de bioacumulación con larvas de pez cebra	123
IV.2. METODOLOGÍA ANALÍTICA	126
IV.2.1. Medios de cultivo.....	126

IV.2.2. Huevas de lumpo	127
IV.2.3. Larvas de pez cebra	128
IV.2.4. Validación del método analítico desarrollado	129
IV.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	132
IV.3.1. Optimización de las condiciones de separación	132
IV.3.2. Identificación y cuantificación de SSRIs	133
IV.3.3. Optimización de la etapa de extracción y clean-up	138
IV.3.3.1. Medios de cultivo	138
IV.3.3.2. Huevas de lumpo	139
IV.3.3.3. Larvas de pez cebra	141
IV.3.4. Validación de la metodología analítica propuesta	142
IV.3.5. Ensayos de bioacumulación	144
Capítulo V. APLICACIÓN DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA DESARROLLADA PARA DETERMINAR NSAIDs, REGULADORES LIPÍDICOS Y SSRIs EN MUESTRAS ALIMENTARIAS	155
V.1. INSTRUMENTACIÓN, REACTIVOS Y MUESTRAS	159
V.1.1. Instrumentación	159
V.1.2. Reactivos	160
V.2. METODOLOGÍA ANALÍTICA	162
V.2.1. Tratamiento de muestras: extracción y limpieza	162
V.2.2. Análisis de muestras mediante CG-MS	165
V.2.3. Validación de los métodos propuestos	165
V.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	167
V.3.1. Optimización de la separación cromatográfica y condiciones de derivatización	167
V.3.2. Determinación de NSAIDs y SSRIs en muestras de pescados manufacturados	169
V.3.2.1. Optimización del tratamiento de muestra en tejido de trucha	169
V.3.3. Características analíticas de los métodos propuestos: Validación ..	175
V.3.4. Aplicación de las metodologías analíticas propuestas en productos de pescado manufacturados	177

Capítulo VI. CONCLUSIONES	183
Capítulo VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	189
ANEXO A. POLÍMEROS DE IMPRESIÓN MOLCULAR (MIPs)	221
ANEXO B. PUBLICACIÓN CIENTÍFICA - REVIEW	253
ANEXO C. PUBLICACIÓN CIENTÍFICA	268
ANEXO D. APORTACIONES CIENTÍFICAS DERIVADAS DE LA PRESENTE TESIS DOCTORAL	283

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I.1. Propiedades físico-químicas del ácido clofíbrico	39
Tabla I.2. Propiedades físico-químicas de NSAIDs estudiados	42
Tabla I.3. Clasificación de los NSAIDs en base a su estructura química	42
Tabla I.4. Propiedades físico-químicas de los SSRIs estudiados	46
Tabla I.5. Daño ocasionado por exposición prolongada a sustancias tóxicas en España	49
Tabla I.6. Características físico-químicas del hábitat frecuente del pez cebra	62
Tabla I.7. Técnicas más empleadas para la determinación de NSAIDs, reguladores lipídicos y SSRIs	71
Tabla III.1. Condiciones instrumentales utilizadas en el sistema cromatográfico de GC-MS	83
Tabla III.2. Fármacos, reactivos y sorbentes empleados en el desarrollo del método analítico	84
Tabla III.3. Gradiente de temperatura optimizado para el análisis de NSAIDs y ácido clofíbrico	94
Tabla III.4. Valores de tR y m/z optimizados para cada NSAIDs y ácido clofíbrico mediante GC-MS	95
Tabla III.5. Recuperaciones (%) obtenidos para cada analito testado en medios de cultivo (500 μ L) fortificados con 10 ng·mL ⁻¹ de cada analito y 30 ng·mL ⁻¹ de estándar interno usando diferentes solventes de extracción (n = 3)	100
Tabla III.6. Recuperaciones (%) obtenidas para cada analito testado en huevos de lumpo (10 mg) fortificados con 300 ng·g ⁻¹ de cada analito y estándar interno usando diferentes solventes de extracción (n = 3)	101
Tabla III.7. Recuperaciones (%) obtenidas para cada analito testado en huevos de lumpo (10 mg) fortificadas con 300 ng·g ⁻¹ de cada analito y estándar interno, usando diferentes sorbentes (n = 3)	103
Tabla III.8. Recuperaciones (%) obtenidas para cada analito testado en larvas de pez cebra (10 mg) fortificadas con 300 ng·g ⁻¹ de cada analito y 300 ng·g ⁻¹ de estándar interno (n = 3)	104
Tabla III.9. Evaluación del efecto matriz a través de la comparación de pendientes entre el calibrado externo y calibrado en presencia de la matriz para cada analito estudiado en medios de cultivo	105
Tabla III.10. Evaluación del efecto matriz a través de la comparación de pendientes entre el calibrado externo y calibrado en presencia de la matriz para cada analito estudiado en huevos de lumpo	105
Tabla III.11. Evaluación del efecto matriz a través de la comparación de pendientes entre el calibrado externo y calibrado en presencia de la matriz para cada analito estudiado en larvas de pez cebra	105
Tabla III.12. Valores de precisión (%RSD) y recuperación en diferentes días obtenidos para cada analito testado en medios de cultivo, huevos de lumpo (10 mg) y larvas de pez cebra fortificadas a dos niveles de concentración de los cuatro analitos y estándar interno	107
Tabla III.13. Valores de precisión (%RSD) y recuperación (entre días) obtenidos para cada analito testado en medios de cultivo, huevos de lumpo (10 mg) y larvas de pez cebra fortificadas a dos	107

niveles de concentración de los cuatro analitos y estándar interno	
Tabla III.14. Concentración nominal obtenida de cada analito testado en los medios de exposición durante la fase de absorción (0, 6, 24, 43 y 48 horas) y fase de depuración (50, 53, 56 y 74 horas a la concentración de 10 y 50 ng·mL ⁻¹	109
Tabla III.15. Concentración nominal obtenida de cada analito testado en larvas de pez cebra durante la fase de absorción (0, 6, 24, 43 y 48 horas) y fase de depuración (50, 53, 56 y 74 horas expuestas a los cuatro analitos de interés a la concentración de 10 y 50 ng·mL ⁻¹	109
Tabla III.16. Datos de bioacumulación de los fármacos estudiados	113
Tabla IV.1. Condiciones instrumentales utilizadas en el sistema cromatográfico de GC-MS para determinar antidepresivos del tipo SSRI	122
Tabla IV.2. Fármacos, reactivos y sorbentes empleados en el desarrollo del método analítico	122
Tabla IV.3. Gradiente de temperatura optimizado para el análisis de SSRIs	134
Tabla IV.4. Valores de t _R y m/z obtenidos para cada SSRI parental y sus metabolitos mediante GC-MS	135
Tabla IV.5. Recuperaciones (%) y CV (%) obtenidas para cada analito testado en medios de cultivo (500 µL) fortificados con 30 ng·mL ⁻¹ de cada analito y 100 ng·mL ⁻¹ de estándar interno usando diferentes solventes de extracción (n = 3)	139
Tabla IV.6. Recuperaciones (%) y CV (%) obtenidas para cada analito testado en huevos de lumpo (10 mg) fortificados con 240 ng·g ⁻¹ de cada analito y 800 ng·g ⁻¹ de estándar interno usando diferentes disolventes de extracción (n = 3)	140
Tabla IV.7. Recuperaciones (%) obtenidas para cada analito testado en huevos de lumpo (10 mg) fortificados con 240 ng·g ⁻¹ de cada analito y 800 ng·g ⁻¹ de estándar interno usando diferentes sorbentes en la etapa de clean-up (n = 3)	141
Tabla IV.8. Recuperaciones (%) obtenidas para cada analito testado en larvas de pez cebra (10 mg) fortificadas con 240 ng·g ⁻¹ de cada analito y 800 ng·g ⁻¹ de estándar interno (n = 3)	141
Tabla IV.9. Precisión (mismo día y días diferentes), %RSD, obtenidos para cada analito testado en medios de cultivo, huevos de lumpo (10 mg) y larvas de pez cebra fortificadas a dos niveles de concentración con los siete compuestos y Par-d ₆ como estándar interno, analizadas acorde al método descrito en IV.2. Metodología analítica	143
Tabla IV.10. Variación de la concentración media encontrada para cada SSRI en los medios de exposición y factores de bioacumulación calculados acorde a los dos ajustes	149
Tabla IV.11. Variación de la concentración de los metabolitos identificados y relación entre metabolito/compuesto parental en los experimentos de bioacumulación llevados a cabo a 80 µg L ⁻¹ y 300 µg L ⁻¹ de fluoxetina, sertralina, citalopram y paroxetina	151
Tabla V.1. Condiciones instrumentales utilizadas en el sistema cromatográfico de GC-MS	159
Tabla V.2. Fármacos, reactivos y sorbentes empleados en el desarrollo del método analítico	160

Tabla V.3. Gradiente de temperatura optimizado para el análisis de NSAIDs y ácido clofíbrico	167
Tabla V.4. Gradiente de temperatura optimizado para el análisis de SSRIs	168
Tabla V.5. Valores de t_R y m/z establecidos para cada NSAIDs y ácido clofíbrico mediante GC-MS	169
Tabla V.6. Valores de t_R y m/z establecidos para SSRI mediante GC-MS	169
Tabla V.7. Recuperaciones obtenidas para NSAIDs y ácido clofíbrico durante la optimización de la etapa de extracción en muestras fortificadas con los cuatro analitos y triclosán como estándar interno a la concentración de $150 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ y $250 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$, respectivamente ($n = 3$)	171
Tabla V.8. Recuperaciones obtenidas para SSRIs durante la optimización de la etapa de extracción en muestras fortificadas con los cuatro analitos y sus tres metabolitos y paroxetina- d_6 como estándar interno a la concentración de $150 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ y $500 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$, respectivamente	174
Tabla V.9. LOD y LOQs obtenidos para NSAIDs, ácido clofíbrico y SSRIs obtenidos según los métodos analíticos propuestos	176
Tabla V.10. Precision entre días (inter-day) obtenidos para cada analito testado en muestras de tejido de trucha (100 mg) ortificadas a dos niveles de concentración $150 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ y $250 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ de cada NSAIDs y ácido clofíbrico ($250 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ de triclosán como SI) analizadas según método 1 y $150 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ y $500 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ de cada SSRI ($500 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ de triclosán como SI) analizadas acorde al método 2	177
Tabla V.11. Concentración media ($\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$) de NSAID, y ácido clofíbrico y SSRIs en muestras de productos manufacturados derivados del pescado	178
Tabla V.12. Valores de LMR establecidos en carne de ganado bovino y porcino en NSAIDs	181
Tabla A.1. Contaminantes hipolipemiantes encontrados en muestras de leche materna	224
Tabla A.2. Fármacos, reactivos y sorbentes empleados en el desarrollo del método analítico	232
Tabla A.3. Etapas optimizadas en el proceso MISPE	234
Tabla A.4. Condiciones cromatográficas optimizadas para la determinación de ácido clofíbrico en muestras de leche comercial	235
Tabla A.5. Tiempos de retención obtenidos para cada proporción utilizada	237
Tabla A.6. Recuperación (%) obtenido para cada etapa en el polímero MIP y NIP sintetizado	239
Tabla A.7. Composición de las diferentes disoluciones de lavado empleadas y % de recuperación obtenido en la fracción de lavado al incrementar el contenido de MeOH en la disolución de lavado	241
Tabla A.8. % Recuperación obtenidos en la optimización de la etapa de elución	242
Tabla A.9. % Recuperación obtenido en el NIP y MIP durante la etapa de elución en función del contenido de MeOH en AcN en la fase de lavado	243
Tabla A.10. Parámetros obtenidos del ajuste a la isoterma de Langmuir-Freundlich	245
Tabla A.11. % Recuperación obtenida empleando adsorbentes no selectivos comerciales	246
Tabla A.12. Cantidad de proteínas precipitadas para 5 mL de leche con distintos volúmenes de AcN ..	249

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I.1. Rutas de exposición del medioambiente a los contaminantes emergentes	34
Figura I.2. Metabolismo de degradación de los fibratos a ácido clofíbrico	37
Figura I.3. Ruta de biodegradación de ácido clofíbrico	38
Figura I.4. Estructura del regulador lipídico estudiado, ácido clofíbrico (CFB)	39
Figura I.5. Estructura de los antiinflamatorios no esteroides (NSAIDs) seleccionados: Ibuprofen (IBU), Diclofenaco (DC) y Naproxeno (CFB)	41
Figura I.6. Estructura de los antidepresivos inhibidores de la recaptación de la serotonina (SSRIs) seleccionados: Fluoxetina (FLX), Norfluoxetina (NFLX), Sertralina (SER), Norsertralina (NSER), Citalopram (CIT), Desmetilcitalopram (DCIT) y Paroxetina (PAR)	45
Figura I.7. Principales rutas de entrada asociadas a constantes de velocidad y rutas de eliminación de un compuesto químico	52
Figura I.8. Representación adaptada del término bioacumulación en la cadena trófica	55
Figura I.9. Imagen de pez cebra (Danio rerio)	61
Figura III.1. Esquema general del procedimiento analítico desarrollado para la determinación de ibuprofeno, naproxeno, diclofenaco y ácido clofíbrico en medio de cultivo mediante GC-MS	88
Figura III.2. Esquema general del procedimiento analítico desarrollado para la determinación de ibuprofeno, naproxeno, diclofenaco y ácido clofíbrico en huevos de lumpo mediante GC-MS	89
Figura III.3. Esquema general del procedimiento analítico desarrollado para la determinación de ibuprofeno, naproxeno, diclofenaco y ácido clofíbrico en huevos de lumpo mediante GC-MS	90
Figura III.4. Reacción general de alquilación	96
Figura III.5. Reacción general de acilación	96
Figura III.6. Estructura molecular del agente de derivatización seleccionado para este estudio	97
Figura III.7. Efecto del tiempo de derivatización usando MTBSTFA como agente derivatizante en el área de pico en una disolución de $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de cada fármaco	98
Figura III.8. Cromatograma SIM de una solución que contiene $10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ de todos los analitos estudiados como N-trimetilsilil derivados y triclosán como estándar interno	99
Figura III.9. Cromatograma obtenido por GC-MS de una muestra de larvas de pez cebra (10 mg) expuestas durante 48 horas a $50 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ de CFB, IBU, NP y DC (en azul) y larvas fortificadas con $20 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ de cada compuesto (en negro discontinuo)	110
Figura III.10. Variación de la concentración media encontrada en los ensayos de bioacumulación en larvas de pez cebra expuestas a la concentración de ácido clofíbrico $10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ y $50 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	111
Figura III.11. Variación de la concentración media encontrada en los ensayos de bioacumulación en larvas de pez cebra expuestas a la concentración de ibuprofeno a $10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ y $50 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	111
Figura III.12. Variación de la concentración media encontrada en los ensayos de bioacumulación en larvas de pez cebra expuestas a la concentración de naproxeno a $10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ y $50 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	112
Figura III.13. Variación de la concentración media encontrada en los ensayos de bioacumulación en	112

larvas de pez cebra expuestas a la concentración de diclofenaco a 10 ng·mL ⁻¹ y 50 ng·mL ⁻¹	
Figura IV.1. Esquema general del procedimiento analítico desarrollado para la determinación de fluoxetina, sertralina, citalopram, paroxetina y sus metabolitos (norfluoxetina, norsertralina y desmetilcitalopram) en medios de exposición mediante GC-MS	127
Figura IV.2. Esquema general del procedimiento analítico desarrollado para la determinación de fluoxetina, sertralina, citalopram, paroxetina y sus metabolitos (norfluoxetina, norsertralina y desmetilcitalopram) en huevos de lumpo mediante GC-MS	128
Figura IV.3. Esquema general del procedimiento analítico desarrollado para la determinación de fluoxetina, sertralina, citalopram, paroxetina y sus metabolitos (norfluoxetina, norsertralina y desmetilcitalopram) en larvas de pez cebra mediante GC-MS	129
Figura IV.4. Cromatograma obtenido del análisis de una solución estándar de SSRIs a una concentración de 20 ng·mL ⁻¹ de cada analito	135
Figura IV.5. Cromatograma obtenido por GC-MS de una solución estándar de los cuatro compuestos parentales y tres metabolitos a 20 ng·mL ⁻¹ y estándar interno a 50 ng·mL ⁻¹	137
Figura IV.6. Variación de la concentración media encontrada en los medios de cultivo durante los experimentos de bioconcentración a) Paroxetine a 80 ng mL ⁻¹ and b) desmetilcitalopram a 300 ng mL ⁻¹	145
Figura IV.7. Variación de la concentración media encontrada en los ensayos de bioacumulación en larvas de pez cebra expuestas a la concentración de: a) Citalopram a 80 ng mL ⁻¹ and b) Citalopram a 300 ng mL ⁻¹	146
Figura IV.8. Variación de la concentración media encontrada en los ensayos de bioacumulación en larvas de pez cebra expuestas a la concentración de: a) Desmetilcitalopram 80 ng mL ⁻¹ and b) Desmetilcitalopram a 300 ng mL ⁻¹	146
Figura IV.9. Variación de la concentración media encontrada en los ensayos de bioacumulación en larvas de pez cebra expuestas a la concentración de: a) Fluoxetina a 80 ng mL ⁻¹ and b) Fluoxetina a 300 ng mL ⁻¹	147
Figura IV.10. Variación de la concentración media encontrada en los ensayos de bioacumulación en larvas de pez cebra expuestas a la concentración de: a) Norfluoxetina 50 ng mL ⁻¹ y b) Norfluoxetina a 100 ng mL ⁻¹	147
Figura IV.11. Variación de la concentración media encontrada en los ensayos de bioacumulación en larvas de pez cebra expuestas a la concentración de: a) Sertralina 80 ng mL ⁻¹ y b) Sertralina a 300 ng mL ⁻¹	147
Figura IV.12. Variación de la concentración media encontrada en los ensayos de bioacumulación en larvas de pez cebra expuestas a la concentración de: a) Norsertralina 50 ng mL ⁻¹ y b) Norsertralina a 100 ng mL ⁻¹	148
Figura IV.13. Variación de la concentración media encontrada en los ensayos de bioacumulación en larvas de pez cebra expuestas a la concentración de: a) Paroxetina 80 ng mL ⁻¹ y b) Paroxetina a 300 ng mL ⁻¹	148

Figura IV.14. Cromatograma obtenido por GC/MS de una muestra de larvas de pez cebra tras 48 horas de exposición a 300 ng·mL ⁻¹ de Fluoxetina, Sertralina, Citalopram y paroxetina.....	151
Figura V.1. Diagrama de flujo de cada procedimiento analítico desarrollado en función de la familia de productos farmacéuticos	164
Figura V.2. Cromatograma obtenido de una muestra de tejido de trucha fortificada con 400 ng·g ⁻¹ de cada analito y 250 ng·g ⁻¹ de triclosán (SI) tratada con las condiciones optimizadas en este método analítico	172
Figura V.3. Cromatogramas comparativa entre una muestra analizada sin fortificar (color negro) y el cromatograma correspondiente a una muestra de palitos de mar tratada acorde al método 2 fortificada a una concentración de 200 ng·g ⁻¹ de cada antidepresivo y 500 ng·g ⁻¹ de paroxetina-d ₆ (color azul).....	179
Figura A.1. Etapas implicadas en la síntesis de polímeros generados por impresión molecular (P = analito plantilla)	228
Figura A.2. Etapas implicadas en un proceso de extracción sobre un polímero de impresión molecular (MIP)	231
Figura A.3. Figura A.3. Calibrado de ácido clofíbrico en MeOH/Ácido fosfórico medido a 227 nm (a) y 279 nm (b) en un rango de concentración entre de 0 y 5 ng·mL ⁻¹	238
Figura A.4. % Recuperación obtenido en el NIP y MIP bajo diferentes condiciones en la fracción de elución	243
Figura A.5. Etapas globales implicadas en el proceso MISPE optimizado.....	244
Figura A.6. Representación del ajuste a la isoterma de Langmuir-Freundlich; R = 0.999.....	245
Figura A.7. Procedimiento optimizado para la determinación de ácido clofíbrico en muestras de leche comercial	248
Figura A.8. Cromatogramas obtenidos para el análisis de muestras de leche enriquecida con ácido clofíbrico (100 ng·mL ⁻¹)	250
Figura A.9. Cromatograma correspondiente al extracto eluído en la fase móvil tras el proceso MISPE de leche enriquecida para 50 µg·L ⁻¹ de ácido clofíbrico	251

Abreviaturas

4-VP	4-vinilpiridina
AcN	Acetonitrilo
AcOEt	Acetato de Etilo
Ads	antidepresivos de nueva generación
AIBN	Azobisisobutironitrilo
AIDs	Antidepresivos inhibidores de la recaptación de serotonina
BAF	Bioacumulación
BCF	Factor de bioacumulación/bioconcentración
BMF	Factor de biomagnificación
BSTFA	N, O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida
CB	Concentración en peces
CFB	Ácido clofíbrico
CIT	Citalopram
COSMOmic	modelo de screening para micelas
COX-1	isoenzima ciclooxigenasa I
COX-2	isoenzima ciclooxigenasa II
CRM	Material de referencia estándar
CV	Coeficiente de variación
CWD	Concentración del medio en estado de equilibrio
DC	Diclofenaco
DCIT	Desmetilcitalopram
DLLME	Microextracción líquido-líquido dispersiva
DM	Diabetes mellitus
Dow	Coeficiente de reparto octanol-agua en compuestos iónicos
dpf	Después de post-fertilización
d-SPE	Extracción en fase sólida dispersiva
E2	producto farmacéutico 17 β -estradiol
EC	Contaminantes emergentes
EDMA	Etilenglicol dimetacrilato
EE2	producto farmacéutico 17 α -etinilestradiol

EIC	Cromatograma extraído de iones
EPA	Agencia para la Protección del Medio Ambiente
ESI	Ionización electrospray
FLX	Fluoxetina
FLX-d5	Fluoxetina-d5
GC	Cromatografía de gases
GCB	Carbono negro grafitizado
HFBA	ácido heptafluorobutírico
HFBI	heptafluorobutirilimidazol
HPF	Horas post-fertilización
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
IBU	Ibuprofeno
ILs	Líquidos Iónicos
IOC	Compuestos orgánicos ionizables
IRSN	Inhibidores selectivos de la serotonina y la recaptación de noradrenalina
Kow	Coeficiente de partición octanol-agua
LC50	Concentración Letal Media
LLE	Extracción líquido-líquido
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
m/z	Relación masa/carga
MAA	ácido metacrílico
MeOH	Metanol
MIP	Polímero de impresión molecular
MISPE	Procedimiento de extracción en fase sólida
MRL	Valores máximos permitidos
MS	Espectrometría de masas
MTBSTFA	N-Metil-N-tert-butildimetilsililtrifluoroacetamida
nci	Ionización química negativa
NFLX	Norfluoxetina
NIP	Polímero no impreso

NP	Naproxeno
NRI	Inhibidores selectivos de la recaptación de noradrenalina
NSAIDs	Antiinflamatorios no esteroideos
NSER	Norsertralina
NSSA	Antidepresivos noradrenérgicos y serotoninérgicos específicos
OCDE	Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAHs	Hidrocarburos policíclicos aromáticos
PAR	Paroxetina
PAR-d6	Paroxetina-d6
PDA	Detector de matriz de fotodiodos
PPCP	Productos farmacéuticos y de cuidado persona
PSA	Sorbente para aminas primarias y secundarias
PTFE	Politetrafluoroetileno
QqLITMS	Espectrometría de masas híbrida triple cuadrupolo-trampa de iones
QSAR	Relación entre estructura cuantitativa y actividad
QuEChERS	Acrónimo de Rápido, Sencillo, Barato, Efectivo, Robusto y Seguro
rcf	Fuerza centrífuga relativa
REACH	Registro, Evaluación, Autorización y Restricción de sustancias y mezclas químicas
RSD	Desviación estándar relativa
SARI	Compuestos antagonistas de la serotonina e inhibidor de la recaptación
SCAN	Barrido en intervalo de masas
SER	Sertralina
SER-d3	Sertralina-d3
SI	Estándar interno
SIM	Monitorización selectiva de iones
SNC	Sistema nervioso central
SPE	Extracción en fase sólida
SSRIs	Antidepresivos inhibidores de la recaptación de serotonina
TBDMCS	Tert-butildimetilclorosilano

TDAH	Déficit de atención con hiperactividad
TFA	Ácido trifluoroacético
TIC	Cromatograma total de iones
TMCS	Trimetilclorosilano
TOF	Tiempo de vuelo
tR	Tiempo de retención
TRI	Triclosan
UAE	Extracción con sonda de ultrasonidos
UE	Unión Europea
UHPLC	Cromatografía de líquidos de ultra-alta resolución
UK	Reino Unido
US	Ultrasonidos
USP	Sonda de ultrasonidos
UV	Ultravioleta
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad
WWTPs	Plantas depuradoras de aguas residuales
WWTW	Aguas de efluentes de aguas residuales

**Determinación de residuos farmacéuticos en
alimentos y muestras medioambientales.
Evaluación de su toxicidad con larvas de pez
cebra.**

Resumen

La contaminación medioambiental es un tema de preocupación pública creciente. Como consecuencia de su amplio uso y de sus demostradas consecuencias para el medio ambiente y la salud humana, durante la parte final del siglo XX más de 100 compuestos químicos han sido clasificados como contaminantes y a pesar de que muchos de ellos están siendo restringidos en su fabricación y uso, siguen encontrándose en el medio ambiente. Todo contaminante previamente desconocido o no reconocido como tal, cuya presencia en el medio ambiente no tiene por qué ser necesariamente nueva, se conoce como *contaminante emergente*. Actualmente, estos compuestos químicos debido a la falta de regulación, la escasez de datos ambientales y sus repercusiones tóxicas y la falta de métodos analíticos para cuantificarlos suponen una creciente preocupación social y científica. La principal característica de los contaminantes emergentes es que son compuestos de elevada producción o consumo que se vierten de manera continua al medio ambiente por lo que no necesitan ser persistentes para ocasionar efectos negativos.

Entre los contaminantes emergentes presentes en el medio acuático cabe destacar la presencia de residuos farmacéuticos, compuestos perfluorados, hormonas, drogas de abuso y productos de cuidado e higiene personal. Además, en los últimos 10-15 años se han ido sumando a esta lista de contaminantes emergentes otros compuestos, como los nanomateriales, o nuevos antibióticos, de los cuales, aún hoy, se tiene poca información de su comportamiento medioambiental. La principal fuente de entrada de estos compuestos en el medio acuático son las aguas residuales aunque también es destacable el papel que juega la agricultura y la ganadería con el uso de pesticidas y antibióticos como fuentes de contaminación difusa. La presencia de estos contaminantes en el medio acuático puede conllevar su paso a los alimentos a través de la cadena trófica. La determinación de estos compuestos orgánicos es una creciente necesidad que requiere numerosos esfuerzos para desarrollar metodologías analíticas que permitan la identificación y cuantificación de analitos a nivel de trazas.

La presente Tesis Doctoral se centra en el desarrollo de metodologías analíticas nuevas que permitan la determinación de fármacos de amplio uso (antiinflamatorios no esteroideos, NSAIDs, como diclofenac, ibuprofeno y naproxeno; reguladores lipídicos

como ácido clofíbrico e inhibidores de la serotonina conocidos como SSRIs entre los que se han seleccionado fluoxetina, sertralina, citalopram y paroxetina y sus metabolitos, norfluoxetina, norsestralina y desmetilcitalopram) en muestras de pescado y su aplicación para el estudio de la bioacumulación en larvas de pez cebra usando un método alternativo a la guía OCDE 305. En consecuencia, el primer objetivo establecido en esta Tesis es el desarrollo de nuevas estrategias de análisis basadas en métodos miniaturizados de extracción en fase sólida con tres etapas muy diferenciadas: (1) extracción de los compuestos orgánicos con un disolvente orgánico asistido por sonda de ultrasonidos, (2) limpieza de los extractos con un sorbente adecuado y (3) determinación de los analíticos usando cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas como sistema de detección. Las metodologías desarrolladas se han utilizado para analizar muestras de pescado manufacturado (ralladura de mar, palitos de mar, muslitos de surimi o salchichas de mar) con el objetivo de confirmar o descartar la presencia de estos fármacos en productos de consumo.

Por otro lado, hay evidencias demostradas que estos compuestos producen efectos crónicos y letales importantes en los organismos acuáticos. Por ello la legislación europea de producción, distribución y uso de compuestos químicos (REACH) exige la evaluación de la ecotoxicidad de los compuestos químicos a través de tres parámetros principales, el potencial de bioacumulación, la persistencia y la toxicidad. La bioacumulación se define como la acumulación de compuestos químicos en un organismo a través de cualquier vía incluyendo la respiración, ingestión o el contacto directo y en la actualidad, se cuantifica mediante el factor de bioconcentración (BCF). El ensayo de Bioconcentración 305, propuesto por la Organización de Cooperación Económica y de Desarrollo (OCDE), puede ser considerado como el procedimiento más ampliamente aceptado para evaluar este parámetro en compuestos químicos. Esta guía propone evaluar el contenido químico en tejidos de pez previamente expuesto a una concentración de analito durante 42 días en condiciones ambientales bien definidas. Este tipo de experimentos implica el empleo de más de cien peces adultos y un trabajo analítico importante, lo que conlleva que sean muy costosos en términos de reactivos, tiempo y número de animales. Por esta razón, cualquier alternativa a este

tipo de ensayos es bienvenida, de hecho, la normativa REACH destaca la conveniencia de reducir el número de pruebas que involucran animales fomentando el uso de métodos sin animales como enfoque alternativo. Esto puede llevarse a cabo con modelos matemáticos que predigan una propiedad química o actividad biológica basándose en las propiedades de las sustancias o bien con procedimientos experimentales con células o estadios de vida de peces en los que no se considera un animal vivo. Esta última línea de investigación, ha constituido el segundo objetivo de esta Tesis Doctoral. El pez cebra (*Danio rerio*) es un organismo modelo ampliamente usado en procesos biológicos y bioquímicos con gran relevancia ambiental y médica. Las larvas de pez cebra en fase embrionaria se considera una especie no protegida de acuerdo a la regulación vigente. Hasta hace unos años, se encontraban un número limitado de estudios de bioacumulación en estadios tempranos en la literatura (huevos, larvas o embriones). Los estudios llevados a cabo durante la realización de esta Tesis Doctoral para las familias de fármacos elegidas, han mostrado una nula o baja bioacumulación para los fármacos antiinflamatorios (ibuprofeno, naproxeno y diclofenaco) y reguladores lipídicos (CFB). Sin embargo, en el caso de los antidepresivos seleccionados, el estudio ha demostrado evidencias de metabolización en larvas de pez cebra para fluoxentina, sertralina y citalopram.

En conclusión, en la presente Tesis se han desarrollado diferentes metodologías analíticas miniaturizadas que han permitido el análisis de diferentes familias de fármacos de amplio uso (NSAIDs, regulador lipídico y SSRIs) con aplicaciones desde el estudio de bioacumulación en larvas de pez cebra hasta su posible determinación en productos manufacturados comunes derivados del pescado. Esto ha permitido demostrar lo adecuado de los métodos desarrollados para cuantificar los diferentes analitos en muestras con un tamaño muy pequeño (10-100 mg) así como determinar los factores de bioacumulación (BCF) para cada uno de ellos así como una posible metabolización de algunos compuestos usando larvas de pez cebra como método alternativo a la guía OCDE 305.

**Determination of pharmaceutical residues in
food and environmental samples. Evaluation of
the toxicity in zebra fish larvae.**

Summary

The environment is an issue of growing concern. During the 20th century, more than 105 chemical compounds have been regulated as pollutants in our environment and, even though, many of them are being restricted and other new chemicals products are being introduced. Any contaminant previously unknown or not recognized as such, whose presence in the environment is not necessarily new, is known as an emerging pollutant. Currently, these chemical compounds due to the lack of regulation, the scarcity of environmental data and their toxic repercussions and the lack of analytical methods to quantify them are assuming a growing social and scientific concern. The main characteristic of the emerging pollutants is that they are compounds of high production or consumption that are continuously discharged into the environment, so they do not need to be persistent to cause negative effects.

Among the emerging pollutants present in the aquatic environment include the presence of pharmaceutical waste, perfluorinated compounds, hormones, drugs of abuse and personal care products. In the last 10-15 years, a new class of pollutants has taken special importance as emerging contaminants: nanomaterials, of which, even today, little environmental information is available. The main source of entry of these compounds into the aquatic environment is wastewater, although the role developed by agriculture and livestock with the use of pesticides and antibiotics as sources of diffuse contamination is also noteworthy. The presence of these contaminants in the aquatic environment entails their passage to food through the food chain. The determination of these organic compounds is a growing need that requires numerous efforts to develop analytical methodologies that allows the identification and quantification of analytes at the trace level.

This Doctoral Thesis focuses on the development of new analytical methodologies that allow the determination of widely used drugs (non-steroidal anti-inflammatories, NSAIDs, such as diclofenac, ibuprofen and naproxen, lipid regulators such as clofibrilic acid and serotonin inhibitors known as SSRIs among which have chosen fluoxetine, sertraline, citalopram and paroxetine and its metabolites: norfluoxetine, norsertraline and desmethylcitalopram) in fish samples and its application for the study of bioaccumulation in zebrafish larvae using an alternative method to the OECD 305

guide. Consequently, the first objective established in this Thesis is the development of new useful analysis strategies based on miniaturized solid phase extraction methods with three very different stages: (1) extraction of the organic compounds with an organic solvent assisted by ultrasound, (2) cleaning of the extracts with a suitable sorbent and (3) determination of the analytical using gas chromatography coupled to mass spectrometry as a detection system. The methodologies developed have been used to analyze samples of manufactured fish (sea zest, sea sticks, surimi thighs or sea sausages) in order to confirm or rule out the presence of these drugs in consumer products.

On the other hand, there is proven evidence that these compounds produce important chronic and lethal effects in aquatic organisms. Therefore, European legislation on the production, distribution and use of chemical compounds (REACH) requires the evaluation of the ecotoxicity of chemical compounds through three main parameters, the potential for bioaccumulation, persistence and toxicity. Bioaccumulation is defined as the accumulation of chemical compounds in an organism through any route including breathing, ingestion or direct contact and is quantified by the bioaccumulation factor (BCFs). The Bioconcentration 305 test, proposed by the Organization of Economic Cooperation and Development (OECD), can be considered as the most widely accepted procedure to evaluate this parameter in chemical compounds. This guide proposes to evaluate the chemical content in fish tissues previously exposed to an analyte concentration for 42 days under well defined environmental conditions. This type of experiments involves the use of more than one hundred adult fish and an important analytical work, which leads to them being very expensive in terms of reagents, time and number of animals. For this reason, any alternative to these experiments is welcome; in fact, the REACH regulation emphasizes the convenience of reducing the number of tests involving animals by encouraging the use of non-animal methods as an alternative approach. This can be done with mathematical models that predict a chemical property or biological activity based on the properties of the substances or with experimental procedures with cells or life stages of fish in which it is not considered a living animal. This last line of research has been the second objective of this Doctoral Thesis. The zebrafish (*Danio rerio*) is a

model organism widely used in biological processes with great environmental and medical relevance. Zebrafish larvae in embryonic phase is considered a non-protected species according to the current regulation. Until a few years ago, there were a limited number of bioaccumulation studies in early stages in the literature (eggs, larvae or embryos). The studies carried out during the realization of this Doctoral Thesis for families of chosen drugs, have shown a low bioaccumulation for anti-inflammatory drugs (ibuprofen, naproxen and diclofenac) and lipid regulators (clofibrilic acid). However, in the case of selected antidepressants, the study has shown evidence of metabolism in zebrafish larvae for fluoxetine, sertraline and citalopram.

In conclusion, in this Thesis have been developed different miniaturized analytical methodologies that have allowed the analysis of different families of widely used drugs (NSAIDs, lipid regulator and SSRIs) with applications from the study of bioaccumulation in zebrafish larvae to its possible determination in common manufactured products derived from fish. This has allowed demonstrating the suitability of the methods developed to quantify the different analytes in samples with a very small size (10-100 mg) as well as to determine the bioaccumulation factors (BCF) for each one of them as well as a possible metabolism of some compounds using zebrafish larvae as an alternative method to the 305 OECD guide.

**Determinación de residuos farmacéuticos en
alimentos y muestras medioambientales.
Evaluación de su toxicidad con larvas de pez
cebra.**

Capítulo I. Introducción

I.1. CONTAMINANTES EMERGENTES EN EL MEDIO AMBIENTE

Desde hace décadas, compuestos químicos consumidos por parte de la población en agricultura e industria son vertidos de forma masiva a las aguas a través de la red doméstica e industrial. Este hecho, ha provocado que, actualmente, exista una preocupación social creciente hacia la presencia de este tipo de compuestos en el medio ambiente ya que, sin ser conscientes de ello, hay una exposición continua a esta clase de contaminantes que reciben el nombre de de contaminantes emergentes (emerging contaminant, ECs)¹.

Se denomina contaminantes emergentes a aquellos compuestos de distinto origen y naturaleza química cuya presencia e impacto en los distintos compartimentos medioambientales requiere de su estudio para evaluar todas las áreas que permitan proteger la salud humana y del medioambiente. La mayoría de estos compuestos no están todavía regulados y pueden provocar efectos tóxicos y nocivos en los seres vivos. Su peligrosidad radica en diferentes aspectos:

- Su producción y consumo es de forma masiva por lo que el vertido a las aguas es continuado lo que origina, aunque no fueran persistentes, que se llegue a alcanzar concentraciones importantes de los mismos.
- Pueden tener efectos tóxicos en los organismos acuáticos, algunos de ellos, incluso desconocidos en la actualidad.
- Su presencia en el medio ambiente puede provocar un efecto bioacumulativo en los organismos acuáticos.
- Las estaciones depuradoras de aguas residuales no disponen de tecnologías que permitan la eliminación completa de estos compuestos lo cual supone un problema ya que, en ocasiones, estas aguas son reutilizadas para riego o recarga de acuíferos. Además, pueden aparecer en las aguas de consumo humano.

Por todo ello, la detección y determinación de los ECs ha emergido en las últimas décadas como un problema medioambiental importante².

Entre los contaminantes emergentes se encuentran compuestos químicos indispensables en la sociedad para una vida saludable que son usados diariamente por la población, como son los productos de higiene personal (PPCP), o los fármacos. Estos compuestos presentan diferentes propiedades químicas y están presentes en las complejas matrices medioambientales a muy baja concentración (ng L^{-1} y $\mu\text{g L}^{-1}$)³⁻⁴. En los últimos años se han detectado PPCPs y diferentes residuos farmacéuticos en efluentes de aguas residuales, aguas subterráneas, e incluso, en agua potable a niveles traza, o en sedimentos de ríos, siendo su eliminación muy dificultosa a corto plazo³⁻⁴. La presencia de la mayoría de estos compuestos no está regulada y es necesario que la legislación se amplíe para englobar a un mayor número de ECs, de la misma forma que se ha establecido una propuesta para los productos farmacéuticos 17 β -estradiol (E2), 17 α -etinilestradiol (EE2) y diclofenaco como sustancias peligrosas prioritarias^{3,5}. En América del Norte y Europa se está llevando a cabo los primeros intentos de hacer una lista prioritaria de compuestos potencialmente contaminantes así como iniciativas para la minimización de su vertido al medio ambiente². En este sentido, la ley de aguas superficiales de la Comisión Europea se ha regulado un amplio número de compuestos orgánicos e inorgánicos⁵.

Los ECs llegan a las plantas depuradoras de aguas residuales (WWTPs) a través de efluentes urbanos y muchas veces persisten a los tratamientos convencionales aplicados en las mismas, lo que les permite llegar al ecosistema acuático. Por esta razón, los ECs han sido detectados en los efluentes y lodos de las plantas depuradoras y de ahí llegan a aguas superficiales (ríos y lagos), a aguas subterráneas y a aguas de consumo³. Su persistencia depende de las características físico-químicas del contaminante, así como de las condiciones y tecnologías utilizadas en las WWTPs. La incompleta eliminación puede deberse a una menor tendencia a ser adsorbidos por los lodos activados o a una degradación microbiana parcial durante el tratamiento. Sin embargo, aquellos ECs con carácter lipófilo, tienen una fuerte tendencia a adherirse a los lodos de las aguas residuales lo que también constituye una fuente importante de contaminación ya que muchos de estos lodos se están utilizando actualmente en agricultura; los fármacos de uso veterinario que son excretados por vía fecal pueden ser utilizados como estiércol, lo que contribuye a su liberación en el medio ambiente⁶,

haciendo posible su retorno a través de las aguas subterráneas, aguas superficiales o su incorporación a la cadena trófica⁴. De forma general, las rutas de exposición pueden llegar a ser muy complejas y se diferencian entre los entornos rurales y urbanos (**Figura I.1.**). Su presencia y su concentración dependen de diversos factores como la dilución, atenuación natural y tipo de tratamiento que sea aplicado a las aguas residuales⁷.

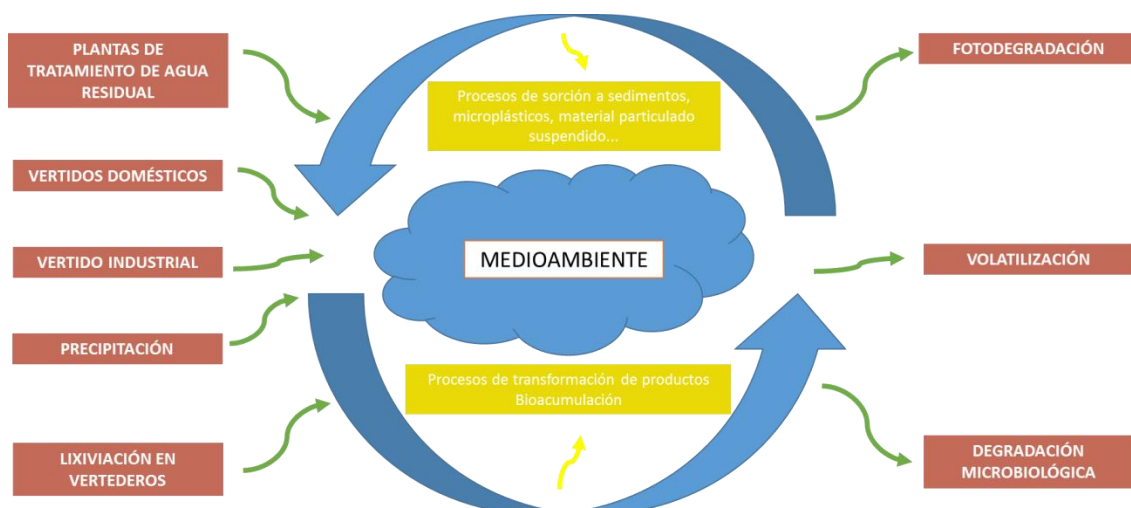


Figura I.1. Rutas de exposición del medioambiente a los contaminantes emergentes.

En 1875, se estableció la “Ley de Aguas” la cual fue derogada posteriormente por la entrada en vigor de la Ley 25/1985, de 2 de Agosto (BOE núm. 189, de 8 de Agosto de 1985). Las medidas legislativas se han ido adaptando conforme han ido apareciendo nuevos contaminantes. Con la entrada de España en la Unión Europea (UE), se han adaptado diferentes medidas legislativas para equiparar nuestra legislación a la europea. El 23 de Octubre de 2000, se crea una nueva directiva llamada “Directiva Marco de Agua”⁸, en la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas (aguas continentales, de transición, costaneras y subterráneas) con el objetivo de reducir progresivamente la contaminación así como minimizar el vertido de sustancias peligrosas prioritarias, promover su uso sostenible y proteger el medio ambiente para mejorar el estado de los ecosistemas acuáticos y minimizar efectos de inundaciones y sequías⁸. Esta directiva presta especial interés al control de 33 sustancias prioritarias recogidas en una lista dinámica⁹, la cual se revisa cada 4 años y en la que se han ido incorporando nuevos compuestos, así como

aspectos biológicos e hidromorfológicos que permiten diagnosticar la calidad del agua. En definitiva, esta directiva ha sido establecida para fijar niveles máximos de concentración en aguas superficiales. Como complemento a esta Directiva, el 12 de Diciembre de 2006 se adoptó la Directiva 2006/118/CE a nivel europeo aplicable a la contaminación y deterioro de aguas subterráneas, la cual modifica a la Directiva Marco de Agua⁸ y en la que se incluyen concentraciones máximas admisibles en aguas superficiales y biota. La legislación española, establece un Real Decreto 140/2003 como complemento a la Directiva Marco del Agua en el que se fijan parámetros sanitarios de la calidad del agua de consumo humano. Estos parámetros incluyen determinación de metales, metales pesados, compuestos orgánicos e inorgánicos como hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs), nitritos, contenido de herbicidas y algunos contaminantes emergentes como los (polibromo) difeniléteres y fluorosurfactantes como el ácido perfluorooctanosulfónico, entre otros, que constituyen un riesgo importante para la salud y/o del medio ambiente¹⁰.

El estudio de los contaminantes emergentes está entre las líneas principales de los Organismos públicos como la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Agencia para la Protección del Medio Ambiente (EPA) o la Comisión Europea¹⁰. Debido a estos estudios, han comenzado a conocerse los efectos que pueden llegar a producir los ECs, como es el caso de algunos fármacos ampliamente utilizados como son los antidepresivos, los cuales pueden ocasionar un riesgo para la fauna acuática, alterando los patrones de comportamiento normales en vertebrados e invertebrados, reducciones en la velocidad de nado e impactos asociados a la eficiencia en la alimentación en peces¹¹. O como los antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDs), que en estudios recientes se ha demostrado su capacidad para producir alteración endocrina en el sistema tiroideo en vertebrados¹². Si bien todavía, no se dispone de información suficiente para evaluar en su totalidad los efectos ecotoxicológicos que ocasionan los ECs¹². La preocupación por el estudio de los contaminantes emergentes es tal que en la última corrección aprobada por la Comisión Europea sobre la Directiva Marco de Agua⁸ se ha incluido una lista con nuevos límites para algunos ECs como hormonas (estrón, estradiol y etinilradiol) diclofenaco, butilhidroxitolueno, 2-etilhexil 4-metoxicinamato, antibióticos macrólidos y pesticidas¹³.

Los contaminantes emergentes más estudiados y que presentan una mayor atención en base a la escasez de datos ambientales y ecotoxicológicos, amplio uso y consecuencias para el medio ambiente son los siguientes:

- Retardantes de llama bromados
- Cloroalcanos
- Pesticidas polares
- Compuestos perfluorados
- Fármacos
- Drogas de abuso
- Metabolitos y/o productos de degradación de los compuestos descritos anteriormente.

En esta tesis Doctoral, se han desarrollado las metodologías analíticas adecuadas para determinar tres grandes grupos de contaminantes emergentes pertenecientes todos ellos a la familia de los fármacos:

- **reguladores lipídicos:** cuyo compuesto principal es el ácido clofíbrico.
- **Antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDs):** ibuprofeno, diclofenaco y naproxeno.
- **Antidepresivos inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (SSRIs)** entre los que se han seleccionado fluoxetina, sertralina, citalopram y paroxetina **y sus principales productos de degradación** (norfluoxetina, norsertralina y desmetilcitalopram).

Las metodologías analíticas desarrolladas se han utilizado para evaluar el potencial de bioacumulación de estos compuestos y sus metabolitos en larvas de pez cebra usando un método alternativo a la guía OECD 305. Además, los procedimientos desarrollados se han aplicado a la determinación de los mismos en muestras de productos manufacturados derivados del pescado.

I.2. FÁRMACOS DE INTERÉS

I.2.1. Reguladores lipídicos

I.2.1.a. Definición y usos

El ácido clofíbrico es considerado el principio activo de los reguladores lipídicos más utilizados: clofibrato, etofibrato y etofilinclofibrato, cuya función es reducir los niveles de triglicéridos en sangre en casos de pacientes con hiperlipidemia.

Los fibratos son compuestos derivados de ácidos ariloxicarboxílicos cuya función es actuar en procesos de hipercolesterolemia. El compuesto más conocido de la familia de los reguladores lipídicos son los clofibratos, un profármaco del ácido clofíbrico (**Figura I.2.**), que es prácticamente inadsorbible por vía oral, lo que pone de manifiesto el empleo de ésteres (etofibrato, ronafibrato) como profármacos para mejorar la adsorción por esta vía¹⁴.

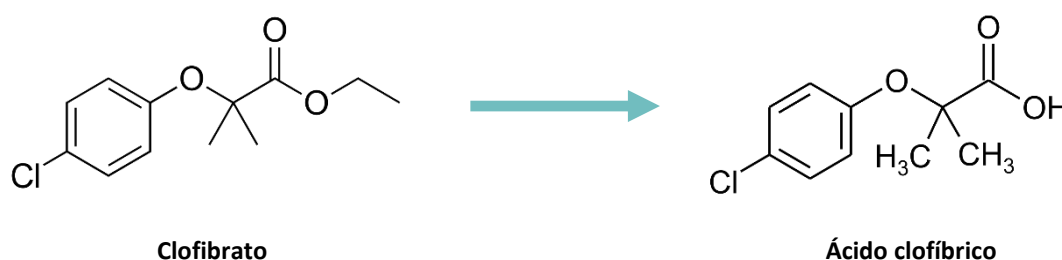


Figura I.2. Metabolismo de degradación de los fibratos a ácido clofíbrico.

El ácido clofíbrico es el metabolito biológicamente activo del clofibrato. Presenta un perfil farmacológico complejo ya que se encarga de inhibir la enzima HMG-CoA reductasa (enzima que controla la vía metabólica que produce colesterol), al igual que las estatinas, y, además, es importante en la movilización de colesterol desde los tejidos extrahepáticos hacia la bilis y las heces. También contribuye al aumento del catabolismo de lipoproteínas de tipo VLDL. El ácido clofíbrico presenta efectos secundarios como la inhibición de la agregación plaquetaria que proviene del bloqueo de la biosíntesis de prostaglandinas¹⁴.

Se caracteriza por ser resistente a la biodegradación microbiana lo que hace que sea encontrado en aguas abiertas¹⁵. Además, este compuesto es resistente a la degradación por tecnologías tradicionales de las plantas de tratamiento de aguas como la adsorción, filtración/coagulación, tratamientos biológicos y cloración lo que hace que sean detectados frecuentemente en efluentes de aguas residuales e incluso aguas de bebida a niveles de $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1} - \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ¹⁶.

Dado su amplio uso, este compuesto ha presentado un interés notable desde el punto de vista analítico y ecotoxicológico debido a su elevada persistencia y su potencial impacto en el medio ambiente. Sin embargo, su biodegradabilidad y ecotoxicidad, es desconocida, lo que ha conllevado a estudiar posibles rutas de biodegradación para determinar metabolitos, elucidar la ruta metabólica y entender si los organismos autótrofos y heterótrofos son los responsables de esta degradación. Estudios de otros investigadores han recogido los principales metabolitos producidos durante la biodegradación de ácido clofíbrico, los cuales se representan en la **Figura 1.3**¹⁵.

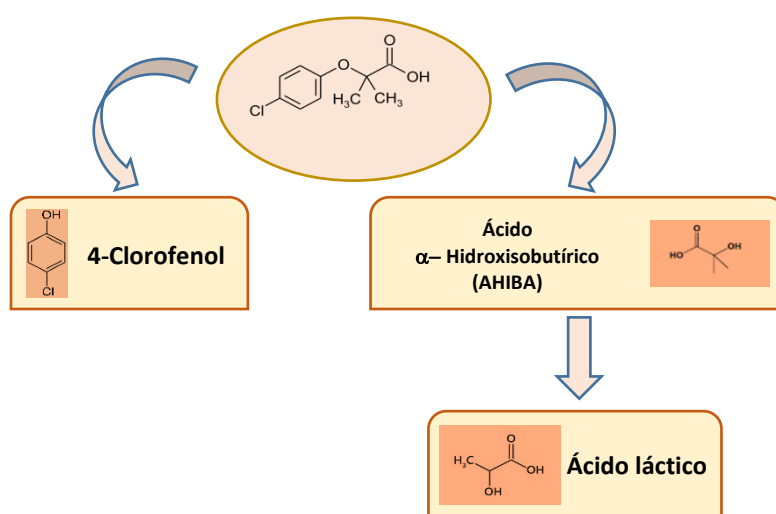


Figura 1.3. Ruta de biodegradación de ácido clofíbrico.

I.2.1.b. Estructura y propiedades físico-químicas

El ácido clofíbrico, presenta una estructura sencilla basada en un anillo bencénico y un grupo ácido¹⁷. Su estructura se recoge en la **Figura I.4**.

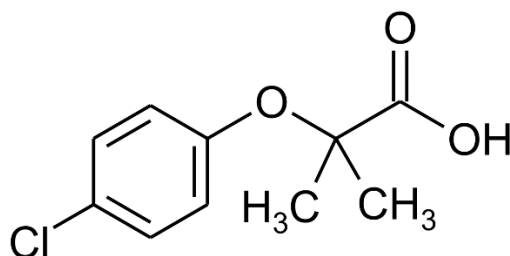


Figura I.4. Estructura del regulador lipídico estudiado, ácido clofíbrico (CFB).

Las propiedades físico-químicas de este fármaco se resumen en la **Tabla I.1**. Es un compuesto hidrofílico y, por lo tanto, polar ($\log K_{ow} = 2.57$), de naturaleza ácida, con valor de pK_a bajo, por lo que se encontrará en su forma neutra a valores de $pH > 3$. En relación a su solubilidad, el ácido clofíbrico es soluble en agua con un potencial de bioacumulación bajo ($\log K_{ow} < 3$).

Tabla I.1. Propiedades físico-químicas del ácido clofíbrico^{15,18,19}.

Compuesto	Abv	CAS	Fórmula	Peso molecular	pK_a	$\log K_{ow}$	$\log D_{ow}$ (pH 7)	LC_{50} ($\mu g \cdot mL^{-1}$)
Ácido clofíbrico	CFB	882-09-7	$C_{10}H_{11}OClO_3$	214.6 g/mol	3.37	2.847	-1.01	89

I.2.2. Antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDs)

I.2.2.a. Definición y usos

Existen varias clases de antiinflamatorios (AIDs): antagonistas de la bradiquinina y la calidina, antihistaminas, no esteroideos (NSAIDs) y corticosteroides que difieren en función de su acción hacia mediadores bioquímicos que se liberan en el proceso de inflamación y propagan la respuesta inflamatoria como péptidos, histamina, serotonina, citoquinas, eicosanoides y factor activador de plaquetas²⁰. Los antiinflamatorios no esteroideos, conocidos como NSAIDs, son una familia de

compuestos con propiedades analgésicas y antipiréticas ampliamente administrados en humanos y en veterinaria como complemento al tratamiento antibiótico. Estos compuestos tienen un mecanismo de acción común basado en la inhibición del ácido araquidónico si bien, muchos de ellos, no están relacionados químicamente²⁰⁻²¹. Su uso prolongado produce ulceración gastrointestinal acompañada, en algunas ocasiones, de anemia y trastornos en la función plaquetaria. Los NSAIDs pueden incorporarse a la cadena alimentaria y producir efectos perjudiciales en el ser humano, por lo que la Unión Europea (EU), a través del Reglamento 2377/90²², ha fijado los valores máximos permitidos en muestras alimentarias (MRL) y ha prohibido su uso en animales productores destinados a consumo. De acuerdo a esta normativa, sólo cinco compuestos NSAIDs han sido permitidos y establecidos los valores de MRL ácido tolfenámico, meloxicam, flunixinina, metamizol y carprofen, siendo el uso de este último permitido sin tener asociado un MRL²⁰.

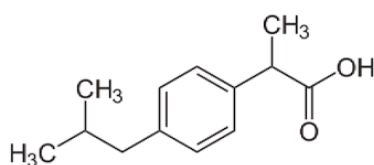
En las últimas décadas, la Unión Europea, la U.S. Food and Drug Administration y otros organismos han ido introduciendo nuevos requerimientos para establecer el riesgo medioambiental como requisito previo para obtener una autorización de comercialización de nuevos productos con fines medicinales. En Junio de 2010, la Unión Europea publicó una lista con 19 posibles nuevas sustancias prioritarias, entre las que se encuentra el ibuprofeno²³. Además, se considera la posibilidad de establecer límites a estos medicamentos por su elevada persistencia y presencia en los sistemas acuáticos. Además, dado el amplio uso de los NSAIDs en seres humanos y en animales, la aparición y los efectos adversos que producen en organismos acuáticos ha llevado en los últimos años a ser incluidos, algunos de ellos, en una lista prioritaria de sustancias que representan un riesgo para el medio ambiente acuático propuesta por la Unión Europea, entre los que se encuentra diclofenaco²⁴.

I.2.2.b. Estructura y propiedades físico-químicas

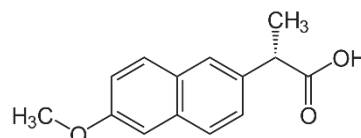
Los antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDs) son un grupo de compuestos de composición química diversa y diferentes potenciales terapéuticos. Presentan tres características comunes: a) propiedades farmacológicas básicas idénticas, b) mecanismo de acción similar y c) efectos adversos similares.

En esta Tesis se han seleccionado algunos de los NSAIDs más ampliamente usados: ibuprofeno, naproxeno y diclofenaco²⁵.

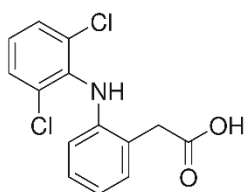
Las estructuras de estas sustancias se recogen en la **Figura I.5**.



Ibuprofeno (IBU)



Naproxeno (NP)



Diclofenaco (DC)

Figura I.5. Estructura de los antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDs) seleccionados: Ibuprofen (IBU), Diclofenaco (DC) y Naproxeno (CFB).

En relación a sus propiedades físico-químicas, estos compuestos se caracterizan por tener carácter ácido. La mayoría de los NSAIDs son ácidos débiles con valores de pK_a comprendidos entre 3.0 y 5.0²⁵, en su mayoría contienen grupos carboxílicos o enólicos, lo que les confiere un carácter hidrofílico y lipofílico por la presencia de anillos aromáticos y grupos halogenados. Las propiedades físico-químicas de estos fármacos se resumen en la **Tabla I.2**.

Tabla 1.2. Propiedades físico-químicas de NSAIDs estudiados^{18, 19}.

Compuesto	Abv	CAS	Fórmula	Peso molecular	pK _a	Log K _{OW}	Log D _{OW} (pH 7) ^a	LC ₅₀ (μg·mL ⁻¹)
Ibuprofeno	IBU	15687-27-1	C ₁₃ H ₁₈ O ₂	206.28 g/mol	4.9	3.79	1.47	173
Diclofenaco	DC	15307-79-6	C ₁₄ H ₁₀ Cl ₂ NNaO ₂	318.13 g/mol	4.0	4.51	0.96	6
Naproxeno	NP	22204-53-1	C ₁₄ H ₁₄ O ₃	230.26 g/mol	4.2	3.10	0.76	560

La clasificación de los NSAIDs está basada en su estructura química, en relación a los grupos que contengan y se muestra en la **Tabla 1.3²⁵**:

Tabla 1.3. Clasificación de los NSAIDs en base a su estructura química²⁵.

CLASIFICACIÓN	EJEMPLO
Derivados de ácido salicílico	Ácido acetilsalicílico, Salicilamida, Salicilato sódico
Derivados de anilina y p-aminofenol	Paracetamol
Derivados de pirazolonas	Fenilbutazona, Propifenazona
Oxicamas	Piroxicam, Meloxicam, Tenoxicam
Derivados del ácido ariralcanoico	Aceclofenac, Diclofenac
Derivados del 2-arilpropiónico (Profenos)	Flurbiprofeno, Ibuprofeno , Ketoprofeno, Naproxeno
Ácidos N-Aril antranílico (Ácidos fenámicos)	Ácido mefenámico, Ácido tolfenámico
Derivados del ácido enólico	-
Coxibs	Celcoxib, Rofecoxib, Etoricoxib, Parecoxib
Derivados de naftilbutanona	Nabumetona
Sulfonamidas	Nimesulida
Derivados de la benzoxazina	Nefopam

La acción de la mayoría de los NSAIDs está basada en la inhibición no selectiva de la enzima ciclooxigenasa en sus dos formas (isoenzima ciclooxigenasa I, COX-1, e isoenzima ciclooxigenasa II, COX-2), cuya función es catalizar la formación del ácido araquidónico en endoperóxidos cíclicos, los cuales se transforman en prostaglandinas y en tromboxanos mediadores de la inflamación. Las prostaglandinas actúan como moléculas mensajeras en los procesos de inflamación²⁵.

I.2.3. Antidepresivos inhibidores de la recaptación de serotonina (SSRIs)

I.2.3. a. Definición y usos

La depresión es un desorden mental muy común entre la población que afecta aproximadamente a 121 millones de personas en todo el mundo, que según la Organización Mundial de la Salud (OMS) será la segunda enfermedad más importante desde el punto de vista mundial para el año 2020. La depresión es una enfermedad crónica que puede conducir al comportamiento suicida, en muchos casos, constituyendo el 50% de todos los casos de intentos de suicidio en el mundo occidental y el 25% de los pacientes con depresión grave intentan este desenlace en menor medida²⁶.

Entre 1960 y 1980, la depresión era tratada con antidepresivos tricíclicos, inhibidores de la monoaminoxidasa y litio. Los efectos secundarios, la toxicidad y las interacciones farmacológicas graves de estos compuestos, en combinación con los avances del conocimiento del sistema nervioso central han llevado a la introducción de varios antidepresivos nuevos (ADs), los cuales actúan más selectivamente en las rutas de la noradrenalina y/o serotonina. Dentro de los ADs de nueva generación, se encuentran las siguientes familias de antidepresivos:

- Inhibidores de la recaptación de la serotonina (SSRI), entre los que se encuentran la fluoxetina, fluvoxamina, sertralina, paroxetina y citalopram.
- Inhibidores selectivos de la recaptación de noradrenalina (NRI), entre los que se encuentran reboxetina, viloxazina y maprotilina.
- Inhibidor selectivo de la serotonina y la recaptación de noradrenalina (IRSN): en esta familia se encuentra la venlafaxina.
- Antidepresivos noradrenérgicos y serotoninérgicos específicos (NSSA): dentro de este grupo se encuentra mirtazapina y mianserina
- Compuestos antagonistas de la serotonina e inhibidor de la recaptación, conocidos como SARI. En este grupo se encuentra la trazodona.

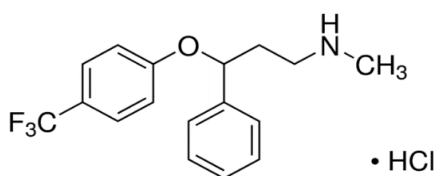
Presentan numerosos efectos secundarios y pueden tener un efecto terapéutico retardado. Además, dado que hoy en día, la medicación psiquiátrica se prescribe en numerosas combinaciones, hay mayor probabilidad de que se produzcan interacciones entre medicamentos²⁶. Tanto el compuesto parental como los metabolitos activos deben determinarse, ya que estos últimos contribuyen tanto al efecto terapéutico como al tóxico. Además, la presencia de metabolitos proporciona información adicional sobre el momento de la ingestión y la capacidad metabólica²⁷. En toxicología forense, la sangre es la matriz postmortem principal, ya que proporciona un vínculo directo entre la concentración del compuesto y el efecto que produce. El tejido cerebral tiene ciertas ventajas sobre las muestras de sangre. Es un compartimento aislado en el que se puede retrasar la putrefacción. Además, la actividad metabólica es menor dando como resultado una mayor presencia de los compuestos originales en comparación con sus productos de degradación. El análisis del cabello proporciona información complementaria, ya que permite conocer si la ingesta se ha producido en un período de tiempo más largo, de varios meses²⁸. Hay estudios en peces que permiten identificar y conocer la concentración así como la distribución de fármacos antidepresivos entre los diferentes órganos (hígado, cerebro y músculo)²⁹.

Los medicamentos de nueva generación han reducido drásticamente los efectos secundarios y el riesgo de sobredosis, factores limitantes de la generación de antidepresivos anterior y una de las principales causas de muerte en pacientes con desórdenes mentales como la depresión. Actualmente, su toxicidad no es del todo conocida³⁰.

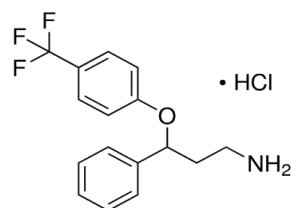
Al igual que otras familias de compuestos como los analgésicos, antibióticos, antiepilépticos, hormonas sintéticas y naturales, los antidepresivos han sido detectados en compartimentos medioambientales²⁹.

I.2.3.b. Estructura y propiedades físico-químicas

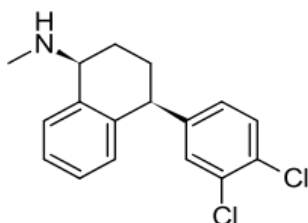
Los antidepresivos de nueva generación, conocidos como SSRIs son un grupo de compuestos de composición química diversa y diferentes potenciales terapéuticos. Las estructuras de estas sustancias se recogen en la **Figura I.6**.



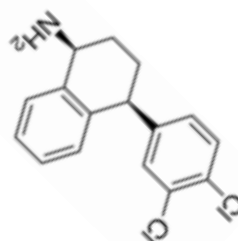
FLUOXETINA



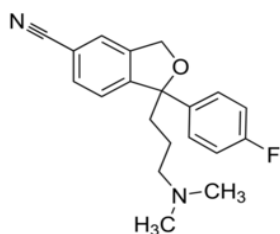
NORFLUOXETINA



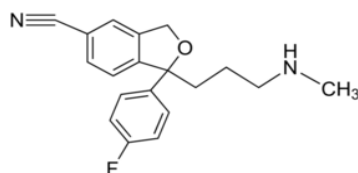
SERTRALINA



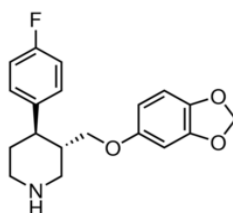
NORSERTRALINA



CITALOPRAM



DESMETILCITALOPRAM



PAROXETINA

Figura I.6. Estructura de los antidepresivos inhibidores de la recaptación de la serotonina (SSRIs) seleccionados: Fluoxetina (FLX), Norfluoxetina (NFLX), Sertralina (SER), Norsertralina (NSER), Citalopram (CIT), Desmetilcitalopram (DCIT) y Paroxetina (PAR).

Los SSRIs son estructuralmente distintos y presentan diferencias en relación a sus perfiles farmacocinéticos y farmacodinámicos. La sertralina y la paroxetina son los SSRIs de mayor potencial de inhibición de la recaptación. En el caso del citalopram y la fluoxetina, son mezclas racémicas de formas quirales con diferentes perfiles farmacocinéticos y farmacodinámicos. En el caso de la fluoxetina, cuyo principal metabolito es la norfluoxetina, es de acción prolongada y activo farmacológicamente. También se diferencian en su tiempo de vida media y en su potencial para inhibir la isoenzima metabolizante del fármaco, el citocromo P450 (CYP)³¹. Las propiedades físico-químicas de estos fármacos se resumen en la **Tabla I.4**.

Tabla I.4. Propiedades físico-químicas de SSRIs estudiados³².

Compuesto	Abv	CAS	Fórmula	Peso molecular	pK _a	Log K _{OW}	LC ₅₀ (μg·mL ⁻¹)
Fluoxetina	FLX	56296-78-7	C ₁₇ H ₁₈ F ₃ NO·HCl	345.79 g/mol	10.1	4.65	0.7
Norfluoxetina	NFLX	57226-68-3	C ₁₆ H ₁₆ F ₃ NO·HCl	331.76 g/mol	9.05	2.05	-
Sertralina	SER	79559-97-0	C ₁₇ H ₁₇ NCI ₂ ·HCl	342.69 g/mol	9.48	2.18	0.12
Norsertralina	NSER	91797-57-8	C ₁₆ H ₁₆ Cl ₃ N	328.66 g/mol	-	-	-
Citalopram	CIT	59729-32-7	C ₂₀ H ₂₁ FN ₂ O·HBr	405.30 g/mol	9.5	3.74	3.9
Desmethycitalopram	DCIT	114025-14-9	C ₁₉ H ₁₉ FN ₂ O·HCl	346.83 g/mol	-	-	-
Paroxetina	PAR	110429-35-1	C ₁₉ H ₂₀ FNO ₃ ·HCl·H ₂ O	374.73 g/mol	9.9	3.95	0.58

I.3. DISTRIBUCIÓN DE RESIDUOS FARMACÉUTICOS EN EL MEDIO AMBIENTE

Los fármacos constituyen un grupo de compuestos ampliamente consumidos desde el punto de vista medicinal para tratar enfermedades en humanos y animales lo que ha conllevado a alcanzar cifras de ventas de US\$602 billones en el año 2008³³. Múltiples estudios contemplan un número aproximado de fármacos que están siendo preescritos para uso humano y veterinario en países desarrollados. A escala global, se han llegado a encontrar hasta 10000 compuestos farmacéuticos reportados en US y 4000 compuestos para Europa³⁴.

Como consecuencia del incremento en el consumo de fármacos, el vertido al medio ambiente aumenta proporcionalmente. Esto hace que, en las últimas dos décadas, se hayan detectado diversos residuos farmacéuticos de prescripción médica o de venta libre en aguas de efluentes de aguas residuales (WWTW), aguas superficiales y subterráneas e, incluso, se han dado casos de haber sido detectados en suministros de agua³³.

En la actualidad, existen escasos programas de seguimiento sistemático y estudios completos que evalúen el riesgo potencial de la exposición humana a concentraciones muy bajas de productos farmacéuticos así como a sus metabolitos presentes en aguas, fundamentalmente, potables. Sin embargo, en el ámbito de la literatura científica, pueden encontrarse diversos artículos publicados en donde se exponen métodos de detección que permiten evaluar los riesgos para la salud humana derivados de una exposición continua a estos residuos farmacéuticos basándose en la dosis mínima efectiva⁷.

Sin embargo, dado el amplio número de fármacos prescritos, a partir de los datos de monitorización y efectos ecotoxicológicos, los investigadores pueden llegar a identificar los compuestos químicos de mayor preocupación y aparición y, así, evaluar los riesgos ambientales, de salud humana, monitorización y normativa regulatoria³⁴. La primera detección de fármacos en aguas residuales tratadas tuvo lugar en US en 1976, seguido de UK en 1981, en donde fueron detectados 25 fármacos en aguas de río en concentraciones inferiores a 1 µg·L⁻¹. Otras publicaciones muestran la presencia de residuos farmacéuticos

en otros compartimentos medioambientales como estiércol, plantas acuáticas, sedimentos y ambientes costeros. Además, los compuestos destinados a aplicaciones veterinarias también constituyen una fuente de contaminación importante. Estudios bibliográficos muestran a los antiinflamatorios y los analgésicos como los grupos de fármacos más frecuentemente detectados en el medio acuático, entre los que se encuentran: sulfametoxazol, diclofenaco, trimetoprim, ibuprofeno, naproxeno, paracetamol (acetaminofeno) y, ketoprofeno. Otro grupo de fármacos, como los fármacos destinados a tratamiento psiquiátrico, es recogido por varios investigadores^{32, 35-37}. Concretamente, la carbamazepina, es el segundo compuesto más frecuentemente detectado y cuantificado en aguas de Europa, mientras que diazepam, venlafaxina, desvenlafaxina y fluoxetina se detectan a concentraciones inferiores³⁴.

I.4. NORMATIVA REACH

Existen unos 30 millones de sustancias químicas diferentes que comprenden una producción mundial de 400 millones de toneladas y un valor de 1.641 billones de euros³⁸. Concretamente en Europa, el mayor productor del mundo (34% de la producción), se comercializan 150.000 sustancias diferentes, de las cuales se estima que 30.000 sean de uso común. En relación a datos toxicológicos y ecotoxicológicos, se conocen características de unas 25.000 sustancias y solo se ha llevado a cabo las evaluaciones de riesgo en un 0.7% de las sustancias presentes en el ámbito europeo.

La **Tabla 1.5.** muestra el daño ocasionado por la exposición prolongada a sustancias tóxicas en España.

Tabla 1.5. Daño ocasionado por exposición prolongada a sustancias tóxicas en España³⁹.

Defunciones por la exposición a agentes cancerígenos en los puestos de trabajo por la exposición prolongada a largo plazo (Entre 2.000 y 9.000 trabajadores en España y 74.000 casos en Europa)
5.130 trabajadores contraen asma, 8.550 personas con enfermedad pulmonar obstructiva y 6.840 personas presentan un diagnóstico de dermatitis ocasionado por la exposición laboral a sustancias peligrosas.
El número de defunciones por enfermedades relacionadas por problemas medioambientales se ha triplicado de 1980 a 2004.
El asma afecta al 10% de la población infantil española.
El cáncer infantil (relacionado con factores ambientales en un 98% de los casos) aumenta un 1% cada año por lo que 900 casos nuevos son detectados anualmente.
Problemas de neurodesarrollo infantil (provocado por la exposición a tóxicos) está alcanzando cifras como: el 5-10% de los niños escolarizados presentan problemas de aprendizaje, el 17% tiene problemas de atención con hiperactividad y un 1% de los niños sufren retraso mental.

La normativa REACH entró en vigor el 1 de junio de 2007 según el Reglamento (CE) nº 1907/2006, estableciendo una nueva normativa de Registro de Productos Químicos⁴⁰. Esta norma establece un nuevo marco para la gestión y control del riesgo químico y bajo el acrónimo de Registro, Evaluación, Autorización y Restricción de sustancias y mezclas químicas, se instaura con el objetivo principal de proteger la salud humana y el medio ambiente frente al riesgo que conlleva la fabricación, comercialización y uso de sustancias

y mezclas químicas por parte de fabricantes, importadores y usuarios. Para cumplir con esta normativa, las empresas deben identificar y gestionar todos los riesgos que pueden ocasionar las sustancias que utilizan en sus fabricaciones y comercializaciones en la Unión Europea y, para ello, se debe cumplir con los siguientes procesos⁴¹:

- Registro: toda sustancia fabricada/importada en cantidades iguales o superiores a 1 tonelada/anual debe ser registrada.
- Evaluación: deben evaluarse todos los riesgos de aquellas sustancias que puedan suponer un riesgo para la salud humana y el medio ambiente y, en función de ello, establecer las prioridades.
- Autorización: debe solicitarse una autorización de uso para toda aquella sustancia altamente peligrosa conforme al Reglamento REACH.
- Restricción: aquellos usos que supongan un riesgo inaceptable para la salud

El REACH propone el término de “sustitución” para aquellas sustancias más peligrosas (aproximadamente 2000 compuestos) que deberían desaparecer del mercado si existe una alternativa segura, promoviendo, a su vez, la innovación y competitividad de la industria.

El cumplimiento de la Normativa REACH está basado en diferentes procedimientos aplicables en función de la peligrosidad de la sustancia usada, del volumen de fabricación y de la cantidad utilizada (mayor de 10 Tm/año)⁴². Además, hay que tener en cuenta, el tipo de sustancia a tratar: sustancia altamente preocupante, sustancias sujetas a autorización y sustancias con restricciones. Estas sustancias se clasifican en: tóxicas, persistentes y bioacumulables, carcinógenas, mutágenas y tóxicas para la reproducción; disruptores endocrinos y sensibilizantes.

Acorde a la lista de sustancias sujetas a autorización, resulta necesaria la evaluación del riesgo potencial que presenta cada una de ellas para la salud y el medioambiente. Para ello, es necesario considerar parámetros importantes como la ecotoxicidad, movilidad, persistencia, degradabilidad, potencial de bioacumulación y toxicidad acuática, entre otras propiedades. En concreto, esta normativa considera que una de las características

más influyentes en el riesgo medioambiental es el potencial de bioacumulación de cualquier sustancia química por un organismo ya que, en función de la exposición a la que esté sometido y los efectos adversos que provoque, se puede llegar a valorar y establecer el efecto global que un compuesto puede ocasionar⁴³.

I.5. BIOACUMULACIÓN/BIOCONCENTRACIÓN

La bioconcentración, bioacumulación y biomagnificación son las tres medidas de la acumulación de un compuesto químico en organismo vivo desde su ambiente de vida, pero son fenómenos distintos. El criterio que permite determinar la bioacumulación de un compuesto químico viene dado por su biomagnificación y la bioconcentración⁴⁴. Vamos a definir cada uno de estos procesos, así como la manera de calcularlas.

- **Bioacumulación (BAF):** es el proceso mediante el cual una sustancia química es absorbida en un organismo a través de todas las rutas de exposición, de la misma manera que ocurre de manera natural en el medio ambiente. Constituye el resultado neto entre la absorción química en el organismo a través de la superficie respiratoria y de la dieta y su eliminación a través del intercambio respiratorio, ingesta fecal, biotransformación metabólica del compuesto parental y su dilución asociada al crecimiento del organismo. La **Figura 1.7.** esquematiza las principales rutas de entrada y eliminación de un compuesto químico en un organismo acuático.

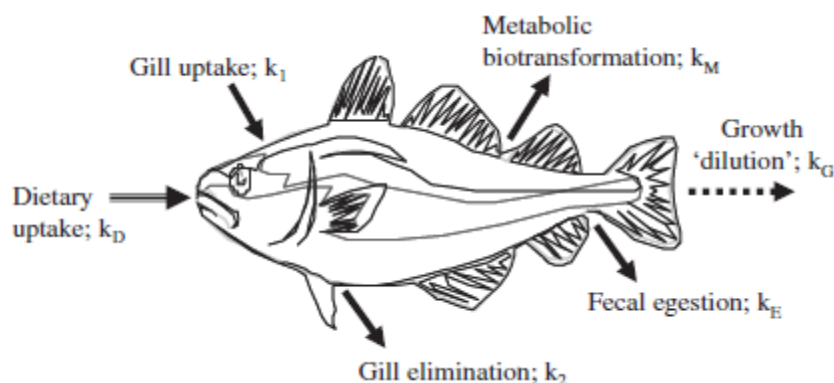


Figura 1.7. Principales rutas de entrada asociadas a constantes de velocidad y rutas de eliminación de un compuesto químico⁴⁴.

Estos procesos competitivos biológicos de captación y eliminación que dan como resultado la bioacumulación pueden representarse matemáticamente mediante un modelo de dos compartimentos organismo-agua como el recogido en la

ecuación 1, en el que se considera que el organismo es un compartimento único en el que el producto químico se mezcla homogéneamente.

$$\frac{dC_f}{dt} = (k_1 \cdot C_w + k_D \cdot C_D) - (k_2 + k_E + k_M + k_G) \cdot C_f \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde C_f es la concentración del compuesto químico en el organismo ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$), t es la unidad de tiempo (d^{-1}), k_1 es la constante de acumulación a través de la respiración ($\text{L} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), k_D es la constante de acumulación a través de la dieta ($\text{kg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), C_w ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) y C_D ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) son las concentraciones del compuesto estudiado en el agua y en la dieta respectivamente, y k_2 , k_E , k_M , k_G son las constantes de eliminación (d^{-1}) a través de la respiración, fecal, biotransformación metabólica y dilución por el crecimiento respectivamente.

El grado en que se produce la bioacumulación se puede expresar como un factor de bioacumulación (BAF) y en estado estacionario, es decir cuando no se modifica la concentración del compuesto en el organismo ($dC_f/dt = 0$), el BAF se puede calcular por la expresión recogida en la ecuación 2.

$$BAF = \frac{C_f}{C_w} = \frac{(k_1 + k_D \cdot \frac{C_f}{C_w})}{(k_2 + k_E + k_M + k_G)} \quad (\text{Ecuación 2})$$

Experimentalmente, se determina en el estado de equilibrio (estacionario), cuando la concentración en el organismo y en el medio ambiente es constante. El problema de la determinación experimental del factor de bioacumulación es que no es fácil el cálculo de la concentración del medio ambiente, porque normalmente, si se utilizan peces, es la suma de la concentración en el agua y la concentración en la dieta, que tienen unidades diferentes. Más complicado todavía si se plantean experimentos con animales terrestres, que el medio ambiente es el aire que le rodea. Por esta importante limitación se ha optado por definir el término bioconcentración y el cálculo del BCF en peces como valor válido de bioacumulación.

- **Bioconcentración:** es el proceso por el cual una sustancia química es absorbida por un organismo del ambiente a través de la superficie respiratoria y dérmica, sin considerar la exposición a través de la ingesta de alimentos. Se ha desarrollado para su aplicación en peces. Así de una manera similar a la bioacumulación, matemáticamente se puede expresar por la ecuación 3.

$$\frac{dC_f}{dt} = (k_1 \cdot C_w) - (k_2 + k_E + k_M + k_G) \cdot C_f \quad (\text{Ecuación 3})$$

y en el estado estacionario puede venir expresado como el factor de bioconcentración (BCF) recogido en la ecuación 4 y se mide en condiciones de laboratorio controladas, sin incluir la ingesta dietética del producto de interés, determinando experimentalmente la concentración en los peces (C_B) y la concentración del agua que le rodea (C_{WD}) en un estado de equilibrio.

$$BCF = \frac{C_f}{C_w} \quad (\text{Ecuación 4})$$

El valor de BCF puede expresarse en función de peso húmedo, peso seco o en base al contenido lipídico.

- **Biomagnificación:** es el proceso mediante el cual la actividad termodinámica de la sustancia química en un organismo supera al de la ingesta a través de la dieta. La **Figura 1.8.** corresponde con la representación adaptada del concepto de bioacumulación a través de la cadena trófica.

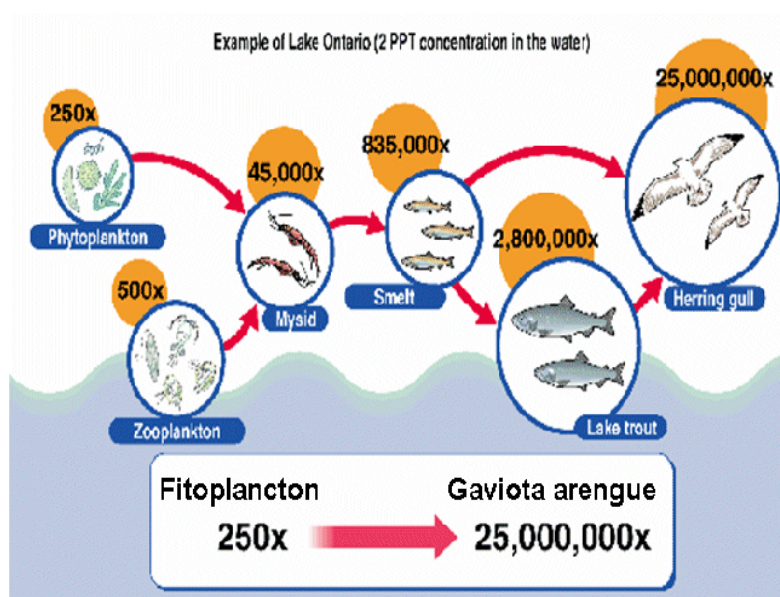


Figura I.8. Representación adaptada del término biomagnificación en la cadena trófica⁴⁵.

Se expresa mediante un factor de biomagnificación (BMF) establecido como la relación entre la concentración de un compuesto químico en un organismo y la concentración establecida en su dieta, que normalmente es un organismo inferior de la cadena trófica (ecuación 5).

$$BMF(SS) = \frac{C_f}{C_d} \quad (\text{Ecuación 5})$$

Cuando no hay datos experimentales sobre la bioacumulación de una sustancia, la primera decisión en cuanto a su clasificación en la escala de bioacumulación se toma a través de herramientas que relacionan la estructura del compuesto con su actividad (Quantitative Structure-Activity Relationships –QSARs). Tradicionalmente, para la bioacumulación se ha utilizado el valor del coeficiente de partición octanol-agua (K_{ow})⁴⁶. Este parámetro viene dado por las propiedades intrínsecas de cada compuesto químico que le confiere el carácter lipofílico e hidrofóbico de un compuesto químico y determinará su forma de distribuirse entre la fase acuosa y la orgánica desde el punto de vista termodinámico. Se ha establecido el criterio que para valores de $\log K_{ow} > 4.5$ se considera que la sustancia es potencialmente bioacumulable y donde valores de $\log K_{ow} >$

6 corresponden con compuestos químicos muy hidrófobos y su capacidad de acumulación en el organismo es muy alta⁴⁴.

El 49% de los compuestos químicos registrados bajo la normativa REACH no están en su estado neutro y, muchos de ellos, se encuentran en su forma cargada y como moléculas ionizadas⁴⁷. Los métodos disponibles para la cuantificación y la evaluación del potencial de bioacumulación de los productos químicos no parecen ser apropiados para los compuestos orgánicos ionizados. Un estudio reciente sobre el cumplimiento de los expedientes de registro (por encima de 1000 t/a) con respecto a los requisitos de datos de 1932 expedientes del REACH⁴⁸ ha revelado que para aproximadamente el 18% de las sustancias registradas, los datos de bioacumulación calculados no eran válidos y fueron rechazados, principalmente porque las sustancias orgánicas estaban ionizadas o eran hidrolíticamente inestables. No está claro si este rechazo está justificado, ya que faltan criterios claros para este tipo de moléculas, ya que el conocimiento adquirido en torno a la descripción de los compuestos neutros no puede transferirse uno a uno a la descripción de los compuestos cargados y, considerando la escasez de datos fisicoquímicos, los modelos mecanísticos son de gran interés⁴⁹.

Uno de los métodos propuestos para la estimación del factor de bioacumulación en compuestos ionizados es el cálculo de D_{ow}^{50} , una corrección de K_{ow} para la fracción neutra de los compuestos ionizados. Pero investigaciones recientes afirman que estos métodos son erróneos ya que el D_{ow} depende enormemente de la concentración y tipo de contraión presentes a medida que un ión cambia de una fase a otra (agua-octanol)⁵¹. Dependiendo de la concentración de la sal, este parámetro, D_{ow} , puede diferir en más de dos órdenes de magnitud. Concretamente, la salinidad y no el pH influyen en la bioconcentración de productos farmacéuticos de base débil como, por ejemplo, carbamazepina, diltiazem y difenhidramina⁵². Actualmente también se están desarrollando nuevos métodos para estimar el coeficiente de partición K_{ow} entre agua y membranas como COSMOmic (CONductor-like Screening MOdel for MICells), basado en la química cuántica y la termodinámica de fluidos⁵¹, o la utilización de constantes de partición liposoma-agua⁴⁶, pero la cantidad de datos de estas constantes son limitadas y son sensiblemente más complicados que la fácil comparación con el K_{ow} .

Por tanto, es todavía muy necesaria la evaluación de la bioacumulación de estos compuestos de manera experimental. Aunque se está haciendo un gran esfuerzo para encontrar métodos QSAR que nos ayuden a estimar los valores de bioconcentraciones realistas y tomar decisiones correctas, es claro que para validar estas estrategias es necesario continuar generando datos experimentales reales que permitan comparar y refinar los métodos QSAR.

Para evaluar los posibles efectos adversos que producen los compuestos químicos en los organismos acuáticos, se utilizan los bioensayos normalizados, denominados Guías de ensayo, los cuales permiten obtener medidas experimentales de la relación concentración-respuesta en base a un efecto provocado por los contaminantes evaluados. Estos ensayos con organismos acuáticos están regulados y permitidos por la comunidad científica internacional. Para la determinación la bioconcentración de un compuesto químico en peces se han propuesto varias guías de ensayo: la Guía 305 de la OCDE, la guía normalizada ASTM E 1022-94 de la American Society for Testing and Materials y la OPPTS 850.1730 de la US EPA (Agencia para la Protección del Medio Ambiente de Estados Unidos), basados en el mismo criterio pero difieren, en las condiciones experimentales:

- a) el método de suministro del agua de ensayo (estático, semiestático o dinámico)
- b) el requisito de realizar un estudio de depuración
- c) el método matemático para calcular el BCF
- d) la frecuencia del muestreo: número de mediciones en agua y de muestras de peces
- e) la necesidad de medir el contenido en lípidos del pez
- f) la duración mínima de la fase de absorción

De estas tres guías de ensayo, el método propuesto para la evaluación del potencial de bioacumulación por el Reglamento Europeo a través de la normativa REACH es el test de bioconcentración 305 de la Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico (OCDE)⁵³.

I.6. GUIA OCDE 305: BIOCONCENTRACION EN PECES ADULTOS.

La Guía de Ensayo 305 propuesta por la OCDE puede considerarse el procedimiento más ampliamente aceptado para la evaluación de los factores de bioconcentración (BCFs) en compuestos químicos. Esta guía propone un procedimiento normalizado que permite determinar el potencial de bioconcentración de cualquier sustancia química en peces expuestos a través del agua, a una concentración determinada de contaminante y bajo unas condiciones definidas de régimen de flujo. La guía propone la evaluación del contenido del contaminante químico en tejidos de peces expuestos a una solución que contiene el analito de interés a una concentración determinada. El tiempo de exposición se mantiene hasta 42 días (si no se alcanza el equilibrio antes) en condiciones medioambientales bien definidas (Temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$, oxígeno $\geq 60\%$, $6 < \text{pH} < 8.5$ y $\text{pH} \pm 0.5$). El proceso presenta dos fases bien diferenciadas: una fase de exposición al contaminante químico de interés, considerada como fase de absorción, y una fase de depuración o post-exposición, en la cual, los peces se transfieren a un medio exento del contaminante. Para determinar el potencial de bioacumulación, la concentración del contaminante en el pez se llevará a cabo en distintos tiempos de muestreo durante todas las fases del ensayo^{43, 54}.

Esta guía de ensayo propone que, para determinar el potencial de bioconcentración es necesario llevar a cabo el ensayo al menos, con dos niveles de concentración. Estas concentraciones son elegidas en base al valor del LC_{50} de cada sustancia (considerando el valor a las 96 horas), de tal manera que las concentraciones a las que se lleven a cabo los ensayos corresponderán con un 1% del valor del LC_{50} para la concentración más alta y 0.1% para la concentración más baja, siempre que los métodos analíticos permitan su determinación. Además, es necesario llevar a cabo un ensayo paralelo en condiciones similares con la diferencia de que el grupo control estará expuesto a un medio en ausencia del analito de interés. Esta normativa indica la estimación aproximada del tiempo que debe durar la fase de absorción/exposición en un ensayo, la cual vendrá dada por el valor de K_{ow} de cada sustancia a analizar y que suele durar 28 días aproximadamente si no se ha llegado al estado de equilibrio antes. En caso de no

alcanzarse el estado estacionario en ese tiempo, la duración de esta fase será ampliada hasta alcanzarse, momento en el que comenzará la fase de depuración.

El factor de bioconcentración, como hemos visto en la *ecuación 4*, vendrá dado por el cociente de la concentración encontrada en el pez dividida entre la concentración del medio. En la revisión que la norma OCDE 305 que tuvo lugar en 2012 se hizo especial énfasis en la posibilidad del uso de ajustes toxicocinéticos utilizando modelos compartimentales para el cálculo del BCF⁵³. Un modelo monocompartimental se produce cuando un producto no es retenido por ningún tejido y no presenta afinidad con él, sino que se difunde por toda la masa corporal. Sin embargo cuando el producto se distribuye de forma no homogénea, más lentamente y concentrándose más en unos tejidos que en otros entonces debemos saber que hay dos o más compartimentos. Utilizando esta última suposición para el cuerpo del pez y teniendo en cuenta que las cinéticas de adsorción suelen ser de primer orden, la concentración que se encuentra en los peces variará con el tiempo según la *ecuación 6*⁵⁵.

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 \cdot C_w - k_2 \cdot C_f \qquad C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_w (1 - e^{-k_2 t}) \quad (\text{Ecuación 6})$$

Donde C_f es la concentración del compuesto químico en el organismo ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$), t es la unidad de tiempo (d^{-1}), k_1 es la constante de acumulación a través de la respiración ($\text{L} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), C_w ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) es la concentraciones del compuesto estudiado en el agua y k_2 es la constante de eliminación (d^{-1}). Cuando se alcanza el equilibrio, la *ecuación 6* puede quedar reducida a la expresión recogida en la *ecuación 7*, que es la definición del factor de bioacumulación.

$$\frac{C_f}{C_w} = BCF = \frac{k_1}{k_2} \quad (\text{Ecuación 7})$$

Este modelo se ha empleado ampliamente para calcular el BCF, pero a veces las cinéticas de primer orden no son adecuadas para ajustar los datos experimentales y deben emplearse modelos más complejos⁵⁶⁻⁵⁷. Por ejemplo, cuando la concentración de exposición del compuesto analizado es variable en el tiempo, se puede utilizar la forma

diferencial del modelo y los datos de exposición se establecen como una función escalonada con decaimiento de primer orden entre los tiempos de intercambio de la solución de exposición (*ecuación 9*).

$$C_f = \frac{k_1 \cdot C_w^0 (e^{-\lambda t} - e^{-k_2 t})}{(k_2 - \lambda)} . \quad (\text{Ecuación 8})$$

donde C_w^0 es la concentración del compuesto al comienzo de la exposición y λ es la constante que recoge la disminución de la concentración del compuesto en la disolución de exposición⁵⁸.

La realización de los ensayos siguiendo la guía OCDE 305 implican el uso de más de 100 peces adultos y requiere un gran trabajo analítico en cuanto a consumo de reactivos, tiempo y número de peces empleados para cada ensayo. Aunque las modificaciones de esta guía permiten reducir el número de peces bajo circunstancias específicas, cualquier alternativa a este método basado en experimentos in vivo resulta alentadora y prometedora. Estas alternativas, también se estimulan desde la regulación REACH, donde se anima a reducir el número de pruebas que involucran animales y desarrollar nuevos ensayos ecotoxicológicos basándose en el empleo de ensayos ausentes de animales como método alternativo. Así las alternativas que se han investigado en los últimos años han sido principalmente en estas dos líneas⁵⁹⁻⁶⁰:

- a) El empleo de modelos matemáticos con el objetivo de predecir una propiedad química o actividad biológica de una sustancia basada en sus propiedades físico-químicas conocidas (QSAR).
- b) Procedimientos experimentales con células o empleo de peces en fase de vida no protegida.

I.7. PEZ CEBRA

El pez cebra (*Danio rerio* o *Brachydanio rerio*) es un organismo modelo ampliamente utilizado en estudios de procesos biológicos de gran importancia ambiental y médica. Es una especie nativa que pertenece a la familia *ciprinidae* y proviene del sureste asiático, distribuyéndose desde las cuencas del Ganges y el Brahmaputra y las aguas dulces tropicales de las regiones monzónicas de la India, Bangladesh, Nepal, Pakistán, Bután, Tailandia y el norte de Myanmar⁶¹. Las ventajas que presenta frente a otros organismos son el pequeño tamaño (alcanzan 5 cm como talla máxima), la facilidad de su crianza y mantenimiento de los ensayos, rápido desarrollo, el breve tiempo entre generaciones, su transparencia óptica en los estados tempranos de su desarrollo y su similitud genética con los seres humanos (aproximadamente 80%)⁶². La **Figura I.9.** muestra una imagen de un pez cebra (*Danio rerio*).



Figura I.9. Imagen de pez cebra (*Danio rerio*).

Esta especie vive en pequeños bancos formados de 5 a 20 individuos que se reproducen y desovan de forma asincrónica. Depositán sus huevos sobre el sustrato, que no son cuidados por los padres después del desove. La fecundación es externa y los huevos, en función de las condiciones ambientales, liberan larvas que nadan libremente después de cuatro a siete días de ser fecundados. De su ciclo de vida, únicamente se conocen datos de laboratorio en donde llegan a alcanzar los 5 años. En relación a su dieta, consumen una amplia variedad de crustáceos, gusanos y larvas de insectos. La **Tabla I.6.** resume las características fisicoquímicas de su hábitat⁶¹.

Tabla I.6. Características físico-químicas del hábitat frecuente del pez cebra.

pH	~ 8.0
Dureza	100 mg/L CaCO ₃
Salinidad	0.4 – 0.6 ppt
Transparencia	~ > 35 cm
Profundidad	> 35 cm
Temperatura del agua	16.5 a 33 °C
Corriente	Inmóvil a 0.1 m s ⁻¹
Sustrato	Barro, lodo, grava

Todas estas características han resultado en un amplio uso de este modelo biológico para estudios de todo tipo, desde el empleo de peces cebra como herramientas para investigar mecanismos genéticos o fisiopatológicos de varios desórdenes neuropsiquiátricos como el trastorno por déficit de atención con hiperactividad (TDAH)⁶³, el uso de peces de cebra para estudiar el genoma esquelético⁶⁴, para estudiar trastornos metabólicos y del sistema nervioso central (SNC), así estudios con estos peces han demostrado que la *diabetes mellitus* (DM) altera las funciones y el comportamiento del cerebro en esta especie, y han permitido establecer la patogénesis del SNC relacionada con la DM en humanos⁶⁵. También es muy importante su utilización en líneas de investigación relacionadas con la ecotoxicidad, para la determinación de los valores de toxicidad (LC₅₀ y EC₅₀) o el seguimiento de las anomalías del fenotipo en los peces expuestos⁶⁶.

Por otro lado, los embriones de pez cebra son pequeños y transparentes y las larvas eclosionan del corion a los 2 o 3 días después de la fertilización (dpf), y todos los órganos principales están bien desarrollados a los 5 dpf. Estas características determinan que la evaluación de su comportamiento puede llevarse a cabo durante un período corto de tiempo. Además los embriones de pez cebra (fase que comienza en la eclosión y termina con la natación libre y autoalimentación del organismo (equivalente a 120 h después de la fertilización a 28,5°C o 139.5 horas a 26°C) son considerados sistemas *in vivo* no protegidos de acuerdo al reglamento actual⁶⁷⁻⁶⁸. Estas características han hecho, que

también el uso de embriones de esta especie se utilice cada vez en más campos de investigación⁶⁹⁻⁷².

I.8. MÉTODO ALTERNATIVO DEL ESTUDIO DE BIOACUMULACIÓN CON LARVAS DE PEZ CEBRA

Como hemos visto, la utilización de embriones de pez cebra en los últimos años en el mundo de la biomedicina y del medio ambiente se ha multiplicado extraordinariamente. En esta línea, en el campo de los estudios ecotoxicológicos, ha sido un hito importante la aprobación por parte de la OCDE del método de medida de la toxicidad aguda utilizando embriones de pez cebra⁷³. Durante más de cuatro años, del 2008 al 2012 el laboratorio de la Unión Europea para el estudio de métodos alternativos (the European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing -EURL ECVAM) ha coordinado con diferentes laboratorios de referencia en la utilización del pez cebra, los estudios comparativos para poder adoptar esta guía como una alternativa importante a la utilización de peces adultos y la generación de datos de igual calidad y robustez⁷⁴.

Siguiendo esta misma línea de investigación, el grupo de investigación al que pertenezco viene testando la utilización de larvas de pez cebra como alternativa a la utilización de peces adultos para el cálculo de factores de bioconcentración⁴³. Utilizando las mismas condiciones restrictivas del test OCDE 305 (Temperatura $26\pm 2^{\circ}\text{C}$, oxígeno disuelto $\geq 60\%$ y pH 6-8.5, concentración de la sustancia a testar por debajo del 1% de su LC_{50} y estable durante todo el periodo del experimento, con una variación máxima del 20%, una concentración máxima de disolvente orgánico de 0.1 mL^{-1}) se sustituye el periodo de acumulación por 48 horas en vez los 28 días indicados en el OECD 305 y 24 horas de depuración en vez de los 14 días indicados en el test original. Para cada compuesto a testar, se seleccionan manualmente 1000 embriones de pez cebra de 72 hpf y se disponen en tres tanques separados correspondientes a: (i) el tanque de control (con medios no contaminados); (ii) el tanque con el medio enriquecido en el nivel de concentración más bajo, y (iii) el tanque con el medio inyectado en el nivel de concentración más alto. Se toman muestras de las larvas a las 0, 2, 6, 21, 29, 45, 48 h de exposición para los experimentos de acumulación y 50, 54 y 72 h de exposición para los experimentos de depuración. En cada caso, se recogieron cuatro grupos de 20 eleutheroembryos y cuatro muestras separadas de 2 mL de medio del control y los correspondientes tanques de exposición para la determinación del analito. Los

eleutheroembryos muestreados se enjuagan tres veces con agua desionizada para eliminar el compuesto (posible) sorbido en su superficie. La mortalidad de los eleutheroembryos se calculó al final de cada experimento y se mantiene por debajo del 20%. Además de las mencionadas condiciones experimentales, la propuesta de test de bioacumulación alternativo hace uso de las ecuaciones compartamentales vistas anteriormente para la descripción del proceso de acumulación (*ecuación 6 y 7*) para ajustar los datos obtenidos experimentalmente y obtener el valor del factor de bioconcentración.

Dicho modelo, siguiendo las recomendaciones de un panel de expertos en pruebas alternativas que estableció algunos principios rectores que deberían seguirse para seleccionar la lista de productos químicos para probar protocolos alternativos para pruebas de letalidad aguda⁷⁵, se ha utilizado para el cálculo de factores de bioconcentración tanto de compuesto orgánicos^{43, 76, 77, 78}, inorgánicos^{62, 80}, o nuevos contaminantes emergentes como las nanopartículas^{81, 82, 83}.

I.9. METODOLOGÍAS ANALÍTICAS

La demanda de resultados analíticos aplicados a muestras reales y diversas con matrices complejas, así como la necesidad de llegar a valores de concentración del orden de $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ conlleva mejorar los métodos analíticos existentes y desarrollar procedimientos nuevos en términos de límites de detección menores, mejor reproducibilidad, precisión y optimización de las etapas del procedimiento analítico para obtener extractos más limpios y minimizar el efecto matriz asociado a las muestras⁸⁴.

Las técnicas analíticas utilizadas para la determinación de fármacos a nivel de trazas en muestras medioambientales han avanzado significativamente en los últimos años. Los grupos de fármacos analizados incluyen principalmente medicamentos psiquiátricos, antiinflamatorios, hormonas sintéticas y antibióticos. Se requiere una exhaustiva preparación de muestra seguido de técnicas de detección sensibles debido a las concentraciones tan bajas existentes en matrices medioambientales y biológicas⁸⁵⁻⁸⁷. Métodos como el QuEChERS⁸⁸, la microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME)^{89,90}, los líquidos iónicos^{90,91} o los métodos de extracción en fase sólida dispersiva (d-SPE)⁹² se están utilizando como métodos alternativos en la búsqueda de la mejora de resultados, lo que supone afrontar mayores desafíos analíticos dentro de la extracción de productos farmacéuticos en matrices complejas.

El desarrollo de un método analítico implica una serie de etapas que se inicia con la preparación de la muestra y finaliza en la obtención de unos resultados. Los pasos intermedios están basados en las condiciones de almacenamiento de la muestra, acondicionamiento, preparación, aislamiento o extracción de los analitos así como su identificación y cuantificación. La fase de preparación de muestra siempre es la etapa más crítica y laboriosa ya que supone aproximadamente el 60% del análisis cuyo objetivo principal es extraer los analitos de interés para poder separarlos de la matriz o de otros componentes que pueden interferir en su determinación y cuantificación. La tendencia existente en la actualidad es la de minimizar la cantidad de solventes a utilizar en la etapa de extracción y reducir el tiempo de análisis para poder procesar mayor número de

muestras. Por ello, se han diseñado equipos o sistemas en donde se ha incorporado la miniaturización, automatización e incluso la robotización en algunos de los casos. En este ámbito, se emplean métodos como extracción en fase sólida, extracción con fluidos supercríticos, extracción asistida con microondas o extracción acelerada con solventes, entre otros. Estos métodos se acoplan a sistemas de detección como cromatografía de gases, cromatografía líquida de alta resolución, espectrofotómetros de absorción atómica, infrarrojos o electroforesis capilar, etc. Esta amplia gama de métodos de extracción así como sistemas de detección permite disponer de una gran capacidad de análisis en los laboratorios. Actualmente, es frecuente encontrar diferentes métodos de extracción y análisis acoplados para la cuantificación de los analitos en un mismo procedimiento. De todas las técnicas mencionadas, extracción en fase sólida (SPE) es la técnica más ampliamente utilizada para el aislamiento y concentración de analitos en matrices como alimentos ya que es compatible con cromatografía de gases (CG) y de líquidos (HPLC). El método de extracción en fase sólida consiste en hacer pasar una muestra diluida a través de un cartucho que contiene un relleno de un material que extrae el analito de interés de forma selectiva desechando así el resto de compuestos que pueden interferir en su análisis. Una de las ventajas que presenta es que, además del proceso de extracción con un disolvente orgánico, es capaz de preconcentrar el compuesto que se esté evaluando, lo que permite reducir los límites de detección y cuantificación del método desarrollado. La técnica de extracción en fase sólida puede llevarse a cabo mediante cartuchos, filtros o con fibras (ésta última conocida como microextracción en fase sólida, SPME). El gran potencial de la SPE y sus modalidades consiste en que el proceso puede ser automatizado en serie o en paralelo, permitiendo reducir tiempos y costes de análisis. Presenta gran versatilidad y aplicabilidad en diferentes áreas (farmacia, ambiente, forense, toxicología, química analítica), pero, fundamentalmente, en alimentos.

Como ya se ha comentado anteriormente, una de las técnicas más comúnmente utilizadas es la extracción en fase sólida (SPE). Esta técnica es considerada por ser un método de extracción y limpieza a micro- y macroescala con gran capacidad para eliminar las interferencias asociadas a la muestra y que podría afectar a la determinación de los analitos. Incluye varias etapas y requieren tiempos de análisis elevados así como un

consumo de disolventes orgánicos importante en comparación con las técnicas modernas derivadas de la SPE. Anastasiades et al. propone una técnica de limpieza de muestras rápida y sencilla a aplicar en matrices alimentarias y medioambientales (frutas, verduras, suelos, sedimentos, aceites, suelos, etc.) conocida como extracción en fase sólida dispersiva (*d*-SPE). Esta técnica mejorada sobre la SPE, está basada en la adición de un material sorbente a un extracto para eliminar las interferencias de la matriz, la cual se desecha posteriormente del extracto orgánico que contiene los analitos por centrifugación. De esta forma, *d*-SPE evita pasar el extracto a través de cartuchos o columnas de SPE, usando una cantidad de sorbente y solvente orgánico menor y reduciendo así costes y tiempo de trabajo. Esta técnica de extracción en fase sólida dispersiva, se incluyó como una técnica novedosa de limpieza para la técnica QuEChERS (rápida, fácil, barata, efectiva, robusta y segura). Las principales ventajas de la extracción en fase sólida dispersiva son su simplicidad, reproducibilidad, bajo coste, velocidad y amplia aplicabilidad a diferentes tipos de muestras y analitos⁹³. El DSPE ha sido aceptado y aplicado como técnica de extracción, aislamiento y limpieza de numerosos compuestos presentes en matrices completas como los fármacos de uso veterinario entre los que se encuentran los antihelmínticos, benzimidazoles, nitroimidazoles, sulfonamidas, quinolonas, tetraciclinas, antiinflamatorios no esteroideos y β 2-antagonistas, los cuales están presentes en tejido animal, productos alimenticios, productos lácteos y aguas de bebida. Adicionalmente, la *d*-SPE ha sido acoplada a técnicas instrumentales para la determinación y cuantificación de estos compuestos en muestras alimentarias como electroforesis capilar acoplada a detección con diodo array o ultravioleta, espectrometría de masas, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplada a detección ultravioleta, fluorescencia acoplada a diodo array o bien cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (MS/MS) o cromatografía líquida ultra-alta resolución (UHPLC) acoplada a espectrometría de masas mediante ionización con electrospray en modo negativo (ESI-MS/MS), MS/MS, DAD y fluorescencia⁹⁴.

Sin embargo, una de las etapas críticas en el método DSPE es la selección del sorbente adecuado en donde hay que considerar las características químicas y físicas que permitan conseguir una interacción máxima entre el sorbente y los analitos para obtener una extracción selectiva de los compuestos de interés, eliminación o preconcentración de los

analitos presentes en las matrices a evaluar. Los sorbentes empleados en *d*-SPE están basados en sílice modificada con varios grupos funcionales como PSA (N-propiletildiamina), C₁₈ (octadecilo), C₂ (etilsilano), aminopropilo (NH₂). Los sorbentes a base de sílice son los más utilizados en el proceso de extracción de compuestos en un amplio rango de pH o en la eliminación de las interferencias presentes en la matriz alimenticia, tales como compuestos orgánicos, colorantes, lípidos y proteínas. Por otro lado, los sorbentes como Z-sep, se han empleado para mejorar la limpieza de muestras en matrices completas, mediante interacciones de Lewis ácidas, o básicas, lo que permite eliminar el contenido graso y el color de los extractos de muestra de una manera más efectiva en comparación con el método tradicional de QuEChERS. Este tipo de sorbentes permite obtener análisis robustos e incluso podría reemplazar a los sorbentes convencionales en numerosas metodologías sin desarrollo de métodos adicionales. El uso de estos sorbentes se ha aplicado en el análisis de varios residuos de medicamentos. En los últimos años, para simplificar el pretratamiento de la muestra y minimizar el consumo de disolventes orgánicos, se han desarrollado y sintetizado varios sorbentes con mayor afinidad, selectividad y capacidad de retención. Estas alternativas en los procesos de extracción, aislamiento y limpieza se basan en el principio fundamental de la DSPE, la dispersión de un sorbente en una muestra en solución. Entre los sorbentes de nueva síntesis se encuentran los sorbentes con partículas magnéticas (constituyendo la extracción en fase sólida magnética), empleo de materiales carbonosos y los polímeros de impresión molecular (MIP), aplicados con éxito para la determinación de residuos de medicamentos⁹⁴.

El método QuEChERS (acrónimo de rápido, fácil, barato, efectivo, robusto y seguro) es una técnica que supone una alternativa viable al método tradicional de extracción en fase sólida o extracción líquido-líquido⁸⁸. Este proceso implica dos etapas diferenciadas:

- 1) Primera etapa: las muestras homogeneizadas se extraen con un disolvente orgánico o solución salina.
- 2) La fase orgánica es extraída y se limpia con un sorbente adecuado usando una técnica de extracción en fase sólida dispersiva (*d*-SPE).

Actualmente, los líquidos iónicos están siendo estudiados como alternativa ecológica a los solventes orgánicos tradicionales. Son líquidos viscosos, de elevada estabilidad térmica y baja presión de vapor, lo que le confiere propiedades características importantes. Son reutilizables y son considerados como reactivos eficientes en comparación con los solventes orgánicos volátiles⁹⁵. Normalmente, están compuestos por un catión orgánico como tetraalquilamonio tetraalquifosfonio o N-alquil o N, N-dialquilimidazolio y un anión poliatómico como hexafluoroborato, hexafluorofosfato, tetrafluoroacetato, trilafto o tliiflimida⁹⁶ y dado a que presenta polaridades únicas, son utilizados junto a los métodos convencionales como extracción líquido-líquido (LLE), sonda de ultrasonidos (UAE) u otros métodos⁹⁷. Actualmente, los líquidos iónicos conjuntamente con métodos DLLME (IL-DLLME) han conseguido reducir la cantidad de tiempo y cantidad de solvente orgánico requerido⁹⁸.

Algunos ejemplos de las técnicas para la determinación de fármacos en muestras medioambientales se resumen en **Tabla I.7**. Como se observa en la tabla, las técnicas de análisis cromatográfico acoplado a espectrometría de masas son las técnicas de separación y cuantificación más frecuentemente empleadas en la determinación de residuos farmacéuticos.

Tabla I.7. Técnicas más empleadas para la determinación de NSAIDs, reguladores lipídicos Y SSRIs.

Familia	Tipo de muestra	Procedimiento analítico	Referencia
NSAIDs	Trucha	USE-GC-MS	[99]
	Aguas subterráneas	SPE-GC-MS	[100]
	Agua	SPE-LC-MS/MS	[101]
	Plasma de pescado	LLE-LC-MS/MS	[102]
	Agua residual	QuEChERS-LC-MS/MS	[88]
	<i>Dreissena polymorpha</i>	LC-MS/MS	[103]
	Agua de río	SPE-GC-MS	[104]
	Agua hospitalaria	SPE-HPLC-MS/MS	[105]
	Plasma de pescado	LLE-LC-MS/MS	[102]
	Agua de grifo y de río	IL-DLLME-HPLC-DAD	[90]
	Agua de Pearl Rivers	GC-NCI-MS	[106]
	Crustáceos	SPE-GC-MS/MS	[107]
	Plasma de pescado	LLE-LC-MS/MS	[102]
	Orina	DLLME-LC-UV	[108]
	Agua de grifo	US-IL-DLLME-UHPSFC-PDA	[109]
	Aguas residuales	SPE-LC-QqLITMS	[110]
	Pez cebra (<i>Danio Rerio</i>)	SPE-LC-MS/MS	[111]
SSRIs	Plasma de pescado	LC-MS/MS	[112]
	Aguas residuales	SPE-UHPLC-ESI-MS/MS	[113]
	Tejido de pescado		[114]
	Agua	LC/ESI-MS/MS	[115]
	Mejillones marinos	SPE-LC-MSn	[116]
	Leche materna	HPLC-ESI-MS	[117]
	Sangre	LLE-GC-MS	[118]
	Tejido de pescado	SPE-PLE-LC-MS/MS	[119]
	Agua	SPME-GC-MS	[120]
	Aguas residuales	DLLMME-UHPLC-DAD	[121]
	Productos nutracéuticos a base de soja	QuEChERS-GC-MS/MS	[122]

**Determinación de residuos farmacéuticos en
alimentos y muestras medioambientales.
Evaluación de su toxicidad con larvas de pez
cebra.**

II. OBJETIVOS

Dado el incremento notable del uso de compuestos farmacéuticos a nivel mundial en las últimas décadas y la creciente preocupación en la comunidad científica, a nivel regulatorio y en la población por el posible impacto potencial y riesgo en los seres humanos y el medioambiente, ha conllevado a desarrollar metodologías analíticas que permitan la determinación de los contaminantes químicos a nivel de trazas ($\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ – $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). Cuantificar estos niveles de concentración tan bajos ha sido posible por los últimos desarrollos recientes en análisis instrumental, el cual ha permitido detectar una serie de sustancias químicas en muestras medioambientales, biológicas y alimentarias en concentraciones muy pequeñas. Estos compuestos químicos, conocidos como contaminantes emergentes (ECs), son usados en nuestra rutina diaria, como los compuestos farmacéuticos y productos de higiene personal, los cuales son introducidos en el medio de forma continua¹²². La mayoría de ellos son persistentes y, por ello, presentan un riesgo potencial para la salud pública y los ecosistemas. De acuerdo a estas premisas y a lo expuesto en la introducción de la presente Tesis, resulta muy importante el desarrollo de nuevas metodologías que permitan determinar mayor número de residuos farmacéuticos de amplio uso para determinar en profundidad el efecto y el riesgo que ocasionan en un amplio espectro de muestras.

Las muestras tratadas en esta Tesis presentan una complejidad añadida, en base al tamaño de la muestra (10-100 mg) y, además, por el contenido lipídico que presentan. Por tanto, el principal desafío que implican las investigaciones llevadas a cabo en torno a los contaminantes emergentes es de disponer de herramientas instrumentales y metodologías analíticas necesarias que permitan identificar y conocer las concentraciones en las que se encuentran en los diferentes ecosistemas. Además, dado el número tan elevado de contaminantes emergentes, los métodos de análisis a desarrollar deben extenderse al grupo de compuestos o familias a las que pertenecen. Estas familias están clasificadas en base a la similitud en su estructura química o en función de sus aplicaciones.

En esta Tesis Doctoral se han estudiado tres familias de contaminantes emergentes de amplio uso: reguladores lipídicos (ácido clofíbrico, CFB), antiinflamatorios no esteroideos (diclofenaco, naproxeno e ibuprofeno, NSAIDs) y antidepresivos inhibidores de la

recaptación de la serotonina (fluoxetina, sertralina, citalopram y paroxetina y algunos de sus metabolitos: norfluoxetina, norsestralina y desmetilcitalpram, todos ellos conocidos como antidepresivos SSRIs). El análisis de todos los fármacos mencionados se ha llevado a cabo mediante cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas.

Los principales objetivos de este trabajo se pueden resumir en varios puntos:

- **Objetivo I:** Desarrollo de metodologías analíticas que sean lo suficientemente sensibles, selectivas y robustas, para el análisis y determinación de los contaminantes emergentes seleccionados en muestras biológicas como tejido de trucha.
- **Objetivo II:** Dada la complejidad de las muestras a tratar, es necesario aplicar técnicas de extracción en fase sólida dispersiva que permitan eliminar el efecto matriz y las interferencias de la misma.
- **Objetivo III:** Las metodologías analíticas desarrolladas se aplicarán a la determinación de los analitos de interés en muestras de productos manufacturados derivados del pescado (ralladura de mar, palitos de mar, muslitos de surimi o salchichas de mar) con el objetivo de confirmar o descartar la presencia de estos fármacos en productos de consumo.
- **Objetivo IV:** Evaluación del potencial de bioacumulación de los fármacos seleccionados para determinar los factores de bioacumulación (BCF) de cada uno de ellos y estudiar una posible ruta de metabolización usando larvas de pez cebra como método alternativo a la guía OCDE 305.

**Determinación de residuos farmacéuticos
en alimentos y muestras
medioambientales. Evaluación de su
toxicidad con larvas de pez cebra.**

**III. Determinación de NSAIDs y ácido
clofíbrico en muestras medioambientales
y alimentarias. Evaluación del factor de
bioacumulación en larvas de pez cebra.**

En este capítulo se describe el desarrollo de una metodología analítica que permite determinar ibuprofeno, naproxeno y diclofenaco como antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDs) y un regulador lipídico el ácido clofíbrico en muestras medioambientales, huevos de lumpo y larvas de pez cebra. Determinación del factor de bioacumulación de cada analito.

III.1. INSTRUMENTACION, REACTIVOS Y MUESTRAS

III.1.1. Instrumentación

Para cada una de las etapas analíticas se va a utilizar el siguiente instrumental analítico. La extracción de los diferentes fármacos se realizó con una sonda de ultrasonidos Vibra Cell (VCx130), provista de una punta de titanio de 2 mm de diámetro y generador de alta frecuencia de 130W a 20 KHz. La etapa de limpieza (clean-up) se realizó con un vórtex Genie-2 (Scientific Industries) y microcentrífuga modelo 5415R (Eppendorf). La evaporación del solvente de los diferentes extractos se llevó a cabo empleando una caja de vacío acoplada a una bomba de vacío modelo N035AN.18 (VacElut 20-place vacuum, Varian) en la que se emplea N₂ (N₂ técnico X50S, Carburos Metálicos).

Para analizar y cuantificar los analitos de interés, se ha utilizado un cromatógrafo de gases modelo 7890 (Agilent Technologies, Madrid, España), equipado con un inyector automático (autoinyector modelo HP 7683B Series) y acoplado a un detector MSD de espectrometría de masas (detector HP 5975C VL MSD, Agilent Technologies, Madrid, España) con un cuadrupolo como analizador de masas. El sistema cromatográfico dispone de una columna capilar de polidimetilsiloxano (95%) entrecruzada, ZB-5 (30 m x 0.25 mm I.D., 0.25 mm), de Phenomenex, usando helio (Pureza > 99.999%) a 1 mL·min⁻¹ como carrier gas. ChemStation es utilizado como software para el tratamiento de los resultados. Las condiciones instrumentales utilizadas en el desarrollo del método se incluyen en la **Tabla III.1.**

Tabla III.1. Condiciones instrumentales utilizadas en el sistema cromatográfico de GC-MS.

Tª de la fuente de iones	230°C
Tª Cuadrupolo	150°C
Tª línea de transferencia	280°C
Rango de masas (modo SCAN)	m/z 50-550

III.1.2. Reactivos

La **Tabla III.2.** muestra los fármacos, reactivos (grado HPLC) y sorbentes utilizados en el desarrollo del método.

Tabla III.2. Fármacos, reactivos y sorbentes empleados en el desarrollo del método analítico.

COMPUESTO	Fórmula empírica/ CASA COMERCIAL
Ácido clofíbrico (CFB)	2-(p-chlorophenoxy)-2-methylpropioniac acid (Sigma Aldrich)
Ibuprofeno (IBU)	(±)-2-(4-isobutylphenyl)propanoic acid (Sigma Aldrich)
Naproxeno (NP)	(S)-(+)-2-(6-methoxy-2-naphthyl)propionic acid (Sigma Aldrich)
Sal de diclofenaco sódico	2 - [(2 , 6 - dichlorophenyl)amino]benceneacetic acid sodium salt (Sigma Aldrich)
Triclosan (TRI) (SI)	5-chloro-2-(2,4-dichlorophenoxy)phenol (Sigma Aldrich)
Cloripirifos	O,O-diethyl O-3, 5, 6-trichloropyridin-2-yl Phosphorothioate (Sigma Aldrich)
Metiltriclosan	2, 4, 4'- Trichloro-2'-methoxydiphenyl ether (Sigma Aldrich)
MTBSTFA + 1 % TBDMCS	N-tert-butyldimethylsilyl-N- methyltrifluoroacetamide (MTBSTFA) + 1 % tertbutyldimethylchlorosilane (TBDMCS) (Sigma Aldrich)
BSTFA + 1 % TMCS	N,Obis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA) + 1 % trimethylchlorosilane (TMCS) (Sigma Aldrich)
Acetonitrilo (AcN)	(Lab-Scan)
Acetato de etilo (AcOEt)	(Lab-Scan)
Metanol (MeOH)	(Scharlau)
Tolueno	(Panreac)
Hexano	(Panreac)
Acetona	(Scharlau)
Silica gel	(Agilent Technologies)
C₁₈	(Agilent Technologies)
PSA	(Agilent Technologies)
Florisil	(Sigma Aldrich)
Agua MilliQ	-

III.1.3. Preparación de las muestras: huevas *de lumpo* y experimentos de bioacumulación con larvas de pez cebra

Dado que las larvas de pez cebra no son sencillas de obtener, para llevar a cabo los estudios de bioacumulación de los distintos fármacos y con el objetivo de utilizar una matriz lo más parecida posible a las larvas y fácil de obtener se seleccionaron las huevas comerciales de lumpo (sucedáneo de caviar) perteneciente a la especie *Cyclopterus lumpus* procedentes de un supermercado local.

Inicialmente, se prepara una solución conjunta con los cuatro fármacos, ibuprofeno, naproxeno, diclofenaco y ácido clofíbrico, la cual es usada para dopar los tres tipos de muestras a diferentes concentraciones dependiendo. Concretamente, los medios de cultivo se dopan a una concentración de 10 y 50 ng·mL⁻¹, las muestras de lumpo a una concentración de 200 y 500 ng·g⁻¹ y las larvas de pez cebra se contaminan a una concentración de 200 ng·g⁻¹.

Los medios acuosos que se utilizan para las pruebas de extracción en los que se simula el experimento de bioacumulación se preparan de forma experimental manteniendo la concentración de sales estipulada en el test 305 de bioconcentración, propuesto por la OECD 305 y en la ISO 7346-1 (294.0 mg·L⁻¹ CaCl₂·2 H₂O; 123.3 mg·L⁻¹ MgSO₄·7 H₂O; 63.0 mg·L⁻¹·NaHCO₃; 5.5 mg·L⁻¹ KCl)^{53, 123}.

Las muestras de larvas de pez cebra de los experimentos de bioacumulación fueron obtenidas de peces adultos, criados y mantenidos en el Centro Tecnológico AZTI (REGA ES489010006105), en condiciones estándar¹²⁴. Los ensayos de bioacumulación se llevaron a cabo con larvas expuestas a los fármacos tras 72 h de la fertilización (hdf). En esta etapa de desarrollo y hasta las 120 horas tras la fertilización, no se consideran animales de laboratorio y pueden mantenerse sin alimentación durante otras 24 horas. Las larvas, se mantienen en el medio acuoso de sales antes mencionado (294 mg de CaCl₂·2H₂O, 123,3 mg de MgSO₄·7H₂O, 63 mg de NaHCO₃ y 5,5 mg de KCl en 1L de agua destilada). Este medio de cultivo se utilizó como vía de exposición a los productos farmacéuticos testados en la presente Tesis Doctoral y es en este medio donde hay que determinar su

contenido para calcular posteriormente el factor de bioacumulación de cada analito estudiado.

Los experimentos de bioacumulación que se llevan a cabo en larvas de pez cebra se realizan en dos fases, acorde al Test 305⁵³ y en base a estudios previos⁴³. Este ensayo consiste en exponer a los embriones de pez cebra a una mezcla de los cuatro compuestos químicos seleccionados para el estudio durante 48 horas (fase de absorción o captación). A continuación, se transfieren a un medio en ausencia de contaminantes durante 24 horas más, constituyendo la fase de depuración. Los experimentos de bioacumulación se llevan a cabo a dos concentraciones de cada NSAIDs y para ácido clofíbrico. Ambas concentraciones son elegidas en base al valor de LC_{50} de cada compuesto siempre que los límites de detección de la técnica permitan la determinación de los analitos testados, en donde la concentración más alta corresponde con el 1% del LC_{50} de cada compuesto y la concentración baja suele diferir en un factor de 10 con respecto a la concentración anterior.

Diferentes estudios han establecido valores de LC_{50} para los analitos evaluados. Los valores de LC_{50} para los analitos evaluados en esta Tesis Doctoral se han establecido en experimentos a partir de experimentos llevados a cabo en algas y peces expuestos descritos en la bibliografía. Para ácido clofíbrico, valores de 318.2 – 526.2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ fueron obtenidos como LC_{50} a las 48 horas del ensayo o 87.22 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ en crustáceos¹²⁵. Para diclofenaco, valores de LC_{50} de 166.6 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ en peces cebra juveniles y un valor de 6.11 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ en estados embrionarios de *D. rerio* fueron obtenidos en estudios de ecotoxicidad aguda¹²⁶. Otros valores de LC_{50} en experimentos a 96 horas de exposición fueron evaluados, con valores de 37.66, 41.56 y 193.34 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ en peces, 25.75, 27.85 y 121.55 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ en crustáceos a 48 horas de exposición y 41.41, 41.13 y 137.94 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ en algas obtenidos para diclofenaco, ibuprofeno y naproxeno, respectivamente¹²⁷. Basándose en los datos bibliográficos, los experimentos de bioacumulación se llevaron a cabo a la concentración de 10 y 50 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ y los medios fueron renovados cada 24 horas para garantizar que la concentración nominal de los cuatro fármacos se mantuviese constante.

Los experimentos de bioacumulación se llevan a cabo en ciclos de 12h de luz/12h en oscuridad bajo las condiciones experimentales propuestas en el test de bioconcentración 305 propuesto por la OCDE: oxígeno disuelto $\geq 60\%$, temperatura controlada de 27°C y pH 6-8.5. Durante el tiempo de exposición de ambos ensayos de bioacumulación, absorción y depuración, se toman muestras tanto de medio de cultivo y como de las muestras constituidas por 20 larvas/muestra en los siguientes tiempos: 0, 6, 24, 48, 50, 54, 69 y 72 h. De esta manera, analizando ambos tipos de muestras a los distintos tiempos de exposición, se puede determinar la concentración absorbida y acumulada de cada analito testado. Todos los tiempos de muestreo son recogidos por triplicado. De acuerdo con la Guía 305 de la OCDE, la tasa de carga de peces al comienzo de los experimentos tiene que oscilar entre 0.7 y $0.8 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (en peso húmedo) y la mortalidad de los peces debe ser inferior al 20% al final de cada experimento.

El factor de bioacumulación (BCF) viene definido como la relación entre la concentración de un compuesto en un organismo y la concentración detectada en el medio de exposición, una vez alcanzado el equilibrio⁵³. El BCF se va a calcular en base a dos enfoques, descritos en la bibliografía⁴³:

- (a) Estableciendo la relación entre las concentraciones del compuesto medidas en el tiempo máximo de exposición y el promedio encontrado en los medios de cultivo para cada compuesto o,
- (b) Calculando el BCF a partir del modelo cinético de primer orden si se alcanza el equilibrio.

III.2. METODOLOGÍA ANALÍTICA

III.2.1. Medios de cultivo

Un volumen de 500 μL de medio de cultivo se trata con 1000 μL de acetato de etilo y a continuación se agita en vórtex para favorecer la extracción de los analitos de la matriz. A continuación se centrifuga y la fase orgánica se separa de la fase acuosa y el contenido orgánico se evapora hasta sequedad bajo condiciones de vacío. Finalmente, el extracto se redissuelve en 80 μL de acetona y se adicionan 20 μL de MTBSTFA para iniciar la reacción de derivatización de los NSAIDs. El extracto se calienta a 70°C durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, 1 μL del extracto derivatizado se analiza por GC-MS en modo SIM¹²⁸⁻¹³⁰. El esquema del procedimiento analítico descrito se describe en la **Figura III.1**.



Figura III.1. Esquema general del procedimiento analítico desarrollado para la determinación de ibuprofeno, naproxeno, diclofenaco y ácido clofíbrico en medio de cultivo mediante GC-MS.

III.2.2. Huevas de lumpo

Se pesan aproximadamente 10 mg de huevas de lumpo en un tubo eppendorf y se extraen con 500 μL de acetonitrilo. La muestra se sónica durante 1 minuto con una potencia de 40%. Los extractos se centrifugan durante 15 minutos a 15°C y 14 rcf. La fase orgánica se transfiere a un vial de HPLC, separándose del extracto del sólido residual y se procede a eliminar el efecto matriz y las interferencias de la misma llevando a cabo una etapa de *clean-up* mediante extracción en fase sólida dispersiva (*d*-SPE), para la cual se utilizan 100 mg de C₁₈ que se adiciona directamente sobre la fase orgánica. Este extracto se centrifuga y se filtra a través de filtros de jeringa de 0.22 μm de PTFE y se evapora llevándolo hasta sequedad. El extracto seco se redissuelve en 80 μL de acetona y 20 μL de

MTBSTFA. Finalmente, los viales son llevados a un horno para que inicie la reacción de derivatización a 70°C durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, se inyecta 1 µL y se analiza el extracto final por GC-MS. El esquema del procedimiento analítico descrito se describe en la **Figura III.2**.

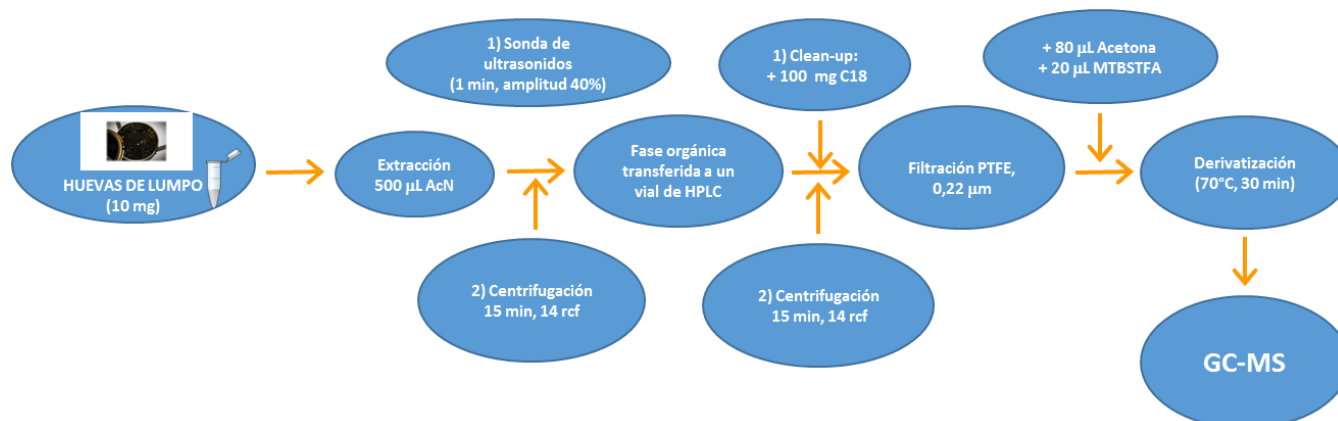


Figura III.2. Esquema general del procedimiento analítico desarrollado para la determinación de ibuprofeno, naproxeno, diclofenaco y ácido clofíbrico en huevos de lumpo mediante GC-MS.

III.2.3. Larvas de pez cebra

Larvas de pez cebra en grupos de 20 larvas/muestra, con un peso total aproximado de 10 mg, se tratan con 500 µL de acetonitrilo. La muestra se sonica durante 1 minuto con una amplitud o potencia de 40%. Los extractos se centrifugan durante 15 minutos a 15°C y 14 rcf. La fase orgánica se transfiere a un vial de HPLC, separándose del extracto del sólido residual y se tratan los extractos con 100 mg de C₁₈ (*d*-SPE), que se adicionan directamente sobre la el contenido orgánico que contiene los analitos extraídos. Este extracto se centrifuga y se filtra a través de filtros de jeringa de 0.22 µm de PTFE y se evapora llevándolo hasta sequedad. El extracto seco se redisuelve en 80 µL de acetona y 20 µL de MTBSTFA. Finalmente, los viales son llevados a un horno para que inicie la reacción de derivatización a 70°C durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, se inyecta 1 µL del extracto final y se analiza por GC-MS. El esquema del procedimiento analítico descrito se describe en la **Figura III.3**.

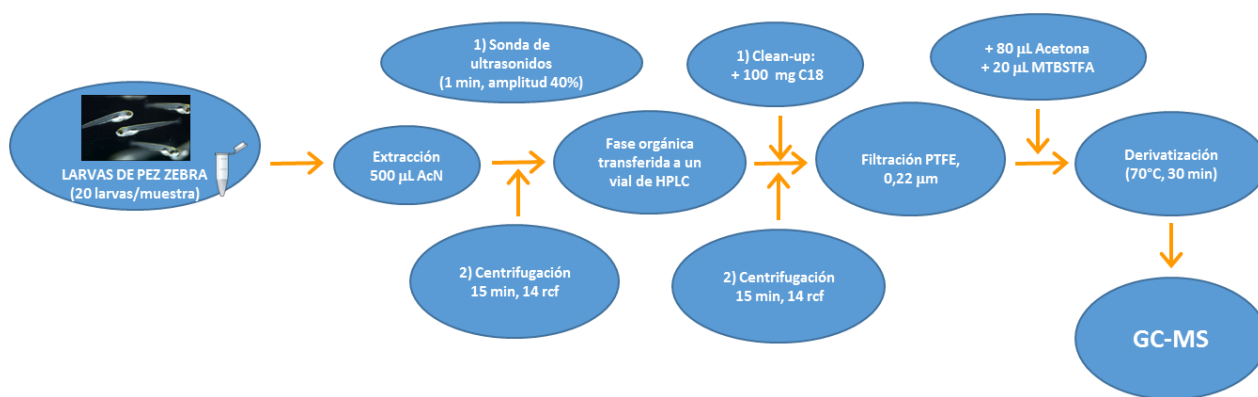


Figura III.3. Esquema general del procedimiento analítico desarrollado para la determinación de ibuprofeno, naproxeno, diclofenaco y ácido clofíbrico en huevos de lumpo mediante GC-MS.

III.2.4. Validación de los métodos analíticos desarrollados

Los métodos analíticos desarrollados se evalúan en términos de linealidad, precisión, recuperación y límites de detección/ cuantificación en blancos de las diferentes muestras estudiadas: medio de cultivo, huevos de lumpo comercial y larvas de pez cebra. La evaluación de los diferentes parámetros de la validación del método analítico permite estimar la existencia de efecto matriz por comparación entre curvas de calibrado externo con calibrado en presencia de la matriz.

- Linealidad y efecto matriz:

Los analitos se extraen con los métodos descritos en las **Figuras III.1., III.2. y III.3.** La linealidad se estudia a partir de un calibrado externo y otro en presencia de la matriz dopando las muestras con concentraciones crecientes a partir de disoluciones preparadas diariamente en el intervalo seleccionado. En el caso de los medios de cultivo, la calibración se lleva a cabo entre 5-200 ng·mL⁻¹ para todos los analitos testados (usando triclosán como estándar interno a la concentración de 30 ng·mL⁻¹). El calibrado realizado a partir de las huevos de lumpo y larvas de pez cebra se lleva a cabo entre 50-1500 ng·g⁻¹ para todos los analitos testados (la concentración de triclosán es de 300 ng·g⁻¹ en ambos tipos de muestras).

- Límites de detección y cuantificación:

El límite de detección y cuantificación fue calculado a partir de la desviación estándar, empleando valores de 3 y 10, respectivamente. Se utilizan blancos dopados a la concentración más baja de cada uno de los analitos en los tres tipos de muestras evaluadas. Estos valores se corrigen acorde al efecto matriz para cada compuesto en cada muestra.

- Recuperación:

Los experimentos de recuperación ($n = 6$) se llevan a cabo usando muestras de medio de cultivo dopadas a la concentración de 10 y 50 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ y muestras de huevas de lumpo y larvas de pez cebra dopadas a concentraciones de cada analito de 200 y 500 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$. La recuperación se evalúa utilizando un calibrado en presencia de la matriz para cada analito analizado, teniendo en cuenta áreas de pico relativas al área del estándar interno, por lo que se obtienen de la recta de calibración representada para cada analito obtenido de blancos fortificados y comparados con el valor teórico añadido.

- Precisión:

La precisión del método se determina a partir del análisis de seis extractos ($n = 6$) en el mismo día (precisión intra-day) y seis muestras en tres días diferentes ($n = 18$) (precisión inter-day). Los extractos se obtienen a partir de muestras fortificadas con todos los analitos a la concentración de 50 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, 200 y 500 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ en huevas de lumpo y 200 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ en larvas de pez cebra. Los resultados se calculan como desviación estándar relativa (RSD, %).

III.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III.3.1. Optimización de la separación cromatográfica

El primer paso para llevar a cabo la determinación de los residuos farmacéuticos en las muestras analizadas fue optimizar la separación cromatográfica con el objetivo de poder determinar, identificar (t_R y m/z) y cuantificar los analitos de interés. Para ello, se preparó una disolución de cada compuesto de forma individual y se optimizó el gradiente de T^a basándose en uno ya existente en la bibliografía¹³⁰. Una vez identificados y conocidos todos los tiempos de retención (t_R) y relaciones masa/carga (m/z) de cada analito, se procedió a realizar la separación cromatográfica a partir de una disolución conjunta de todos los analitos testados.

A partir de los cuatro fármacos comerciales, se prepararon soluciones stocks individuales en metanol de cada compuesto. Para ello, se pesaron 5 mg de cada fármaco y se llevaron a un volumen final de 5 mL. La concentración final de cada disolución stock es de 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Estas soluciones son almacenadas a 4°C en ausencia de luz para evitar posibles degradaciones. Las soluciones de trabajo se prepararon diariamente por dilución de cada standard en metanol, acetonitrilo o agua Milli-Q, según corresponda. Las soluciones stock son estables, al menos, durante 6 meses en estas condiciones.

A continuación, para identificar todos los analitos, se preparan soluciones de trabajo en metanol, a partir de las soluciones stock de cada uno de los analitos a testar. Para ello, se transfiere la cantidad adecuada de cada solución stock para obtener una solución de trabajo de 1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de cada analito. Inicialmente, el gradiente de temperaturas empleado, así como las condiciones de derivatización adecuadas fueron seleccionados de la bibliografía¹³⁰⁻¹³². Los valores de m/z fueron obtenidos del espectro de masas de una solución estándar de 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ cada analito en metanol monitorizados en modo SCAN, bajo las condiciones descritas en la literatura¹³⁰. Este modo permite, no sólo obtener la relación m/z de trabajo sino que también permite identificar los analitos en base a su t_R (min). La monitorización en modo SCAN tiene como principal desventaja que es un modo

menos sensible en comparación con el modo SIM. Las diferencias que presentan son las siguientes:

- Modo SCAN: consiste en hacer barridos entre dos masas para obtener una información completa total del contenido de la muestra a analizar. Es el modo que se emplea en análisis cualitativo para identificación de compuestos por búsqueda en biblioteca de espectros. También puede utilizarse en análisis cuantitativo pero este modo es menos usado para este tipo de aplicaciones. Presenta una sensibilidad media cuando se trabaja con TIC (total ion chromatogram). Es muy selectivo y presenta una buena sensibilidad cuando se trabaja con iones extraídos EIC (extracted ion chromatogram). La sensibilidad se incrementa con la reducción del rango de masas seleccionado.

- * TIC (Total Ion Chromatogram): cromatograma correspondiente a la suma de abundancias a todas las masas adquiridas.

- * EIC (Extracted ion Chromatogram): cromatograma correspondiente a una determinada masa, la cual es extraída del barrido).

- Modo SIM: consiste en una monitorización selectiva de iones característicos de los compuestos presentes en la muestra. En modo SIM, el detector MSD es muy sensible y selectivo. Es utilizado en análisis cuantitativo de trazas de compuestos conocidos, llegando a poder cuantificar compuestos que coeluyen. La comparación de las respuestas relativas de los distintos iones, con respecto a la del patrón, permite confirmar la identificación del compuesto cuantificado. La sensibilidad aumenta con la reducción del nº de masas seleccionadas y la selectividad se incrementa con el aumento de la masa monitorizada. La modalidad SIM con cuadrupolo proporciona, especialmente a nivel de trazas, una mejor reproducibilidad cuantitativa que el modo SCAN, no obstante éste (SCAN) admite mayores concentraciones de analito. En modo SIM, el TIC es el cromatograma correspondiente a la suma de abundancias de todas las masas adquiridas.

El uso de estándar interno permite corregir fluctuaciones instrumentales o del método analítico. El estándar interno es especialmente útil cuando la cantidad de muestra analizada es muy pequeña o cuando la respuesta del equipo con el que se analiza varía de

ensayo a ensayo, de tal forma que considerando señales relativas como la relación entre el área del analito y el área del estándar interno, se espera que la variación afecta de la misma manera a cada analito como al estándar interno, por lo que el error es asumible y se corrige. El estándar interno debe tener un comportamiento y características semejantes a la de los analitos de interés en cuanto a peso molecular similar y contener grupos derivatizables en su estructura¹³³⁻¹³⁷.

En la presente Tesis Doctoral, se han separado, identificado y cuantificado, ácido clofíbrico, ibuprofeno, naproxeno y diclofenaco, mediante GC-MS. La cuantificación de los cuatro analitos fue corregida mediante el uso de estándar interno, siendo triclosán el compuesto elegido para este estudio. Para ello, se evaluaron varios estándares, entre los que se encuentran clorpirifos, metiltriclosan y triclosán. Tras el análisis de todos ellos, en modo SCAN y modo SIM, se seleccionó el triclosán como estándar interno, ya que proporcionó una elevada sensibilidad y una resolución adecuada.

Una vez seleccionado el estándar interno óptimo, se testaron diferentes gradientes de temperatura para conseguir una buena separación entre todos los analitos y el estándar interno y minimizar las interferencias por parte de la matriz. El gradiente de temperaturas óptimo se muestra en la **Tabla III.3**.

Tabla III.3. Gradiente de temperatura optimizado para el análisis de NSAIDs y ácido clofíbrico.

Rampa	Temperatura (°C)	Tiempo de espera (min)
-	70°C	1 min
20°C/min	120°C	-
8°C/min	200°C	-
15°C/min	280°C	3 min

Los valores de m/z seleccionados para la cuantificación de los analitos, obtenidos de los correspondientes espectros de masas se muestran en la **Tabla III.4**. A partir de estos datos obtenidos en modo SCAN para cada analito, se hizo un barrido en modo SIM para cuantificar los analitos testados, usando la suma de área de los iones seleccionados para

cada compuesto. Los valores m/z obtenidos, están en concordancia con lo encontrado en la literatura¹³⁰.

Tabla III.4. Valores de t_R y m/z obtenidos para cada NSAIDs y ácido clofíbrico mediante GC-MS.

Substance	t_R (min)	Detected m/z
Ácido clofíbrico	13.37	143, 271, 273
Ibuprofeno	13.85	161, 263, 264
Naproxeno	17.88	185, 188, 287
Diclofenaco	19.36	214, 352, 409

III.3.2. Optimización de las condiciones de derivatización

La cromatografía de gases es una técnica analítica de amplio uso la cual permite analizar fármacos de diversa índole, como drogas de abuso, analgésicos, antiinflamatorios y reguladores lipídicos, entre otros. Las principales ventajas que presenta es que es una técnica simple, sensible, de bajo coste y, desde el punto de vista medioambiental, genera una cantidad mínima de residuos¹³⁸. Sin embargo, dada la baja volatilidad de los compuestos farmacéuticos suele ser necesario un proceso de derivatización para poder ser compatible su determinación con esta técnica¹³⁹. La derivatización química constituye una práctica ampliamente empleada para la determinación y separación de compuestos con baja volatilidad mediante cromatografía de gases. Existen numerosos estudios en los cuales los análisis se llevan a cabo por técnicas de cromatografía de gases, que van acompañados de tratamientos de muestra complejos y con largos tiempos de preparación de muestra. Por lo general, todos ellos requieren etapas de derivatización previas al análisis, etapas que resultan críticas para conseguir que los analitos presenten una volatilidad suficiente y por lo tanto proporcionen una respuesta cromatográfica adecuada y así un método suficientemente sensible.

Para el análisis por cromatografía de gases, las moléculas con grupos funcionales como $-COOH$, $-OH$, $-NH$ y $-SH$ son de especial preocupación por su capacidad de formar enlaces de hidrógeno entre los compuestos, lo que conlleva a una volatilidad baja, estabilidad insuficiente o interacciones entre los compuestos con el relleno de la columna del

sistema cromatográfico. Como resultado, la sensibilidad del método desarrollado no sería adecuada para conseguir niveles de detección de $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ o $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ¹³⁴. La derivatización se realiza, generalmente, mediante sustituciones en los grupos polares, donde las reacciones más frecuentes son la alquilación, acilación y sililación ^{132- 133, 140}.

- Alquilación: consiste en la sustitución de un hidrógeno activo en R-COOH, R-OH, R-SH y R-NH₂ por un grupo alquilo o, incluso, en ocasiones, por un grupo arilo. La esterificación constituye el método de alquilación más frecuente y está basado en la reacción de un ácido con un grupo alcohol en presencia de un catalizador (**Figura III.4.**).



Figura III.4. Reacción general de alquilación.

- Acilación: es un tipo de reacción en la cual se introduce un grupo acilo en un compuesto orgánico. Los compuestos que contienen hidrógenos activos se convierten a grupos ésteres, tioésteres y amidas, respectivamente (**Figura III.5.**).



Figura III.5. Reacción general de acilación.

- Sililación: consiste en la introducción en una molécula de un grupo sililo, como dimetilsilil [SiH(CH₃)₂], t-butildimetilsilil [Si (CH₃)₂C(CH₃)₃] y clorometildimetilsilil [SiCH₂Cl(CH₃)₂]. Dependiendo del grupo funcional inicial que contenga el compuesto, la reactividad de sililación será diferente, siguiendo el orden: alcohol > fenol > carboxilo > amino > amida/hidroxilo. En el caso de los grupos alcoholes, serán más reactivos los grupos primarios, seguido de los secundarios y por último, los alcoholes terciarios son los menos reactivos ante este tipo de reacciones de derivatización ¹³⁴. En comparación con sus compuestos parentales, los derivados sililados presentan mayor volatilidad, menos polaridad y son térmicamente más

estables. Como resultado, se mejora tanto la separación cromatográfica como la determinación de los analitos de interés.

La reacción de sililación suele llevarse a cabo con la N-terc-butildimetilsilil-N-metiltrifluoroacetamida (MTBSTFA) como agente de derivatización, ampliamente usado en la literatura para la determinación de compuestos similares a los estudiados en la presente Tesis¹³³. La **Figura III.6.** representa la estructura molecular del agente sililante seleccionado.

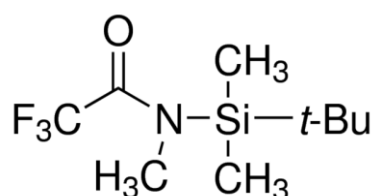


Figura III.6. Estructura molecular del agente de derivatización seleccionado para este estudio.

En el presente trabajo, se seleccionó la reacción de sililación como procedimiento de derivatización de los analitos y se evaluaron dos reactivos sililantes la mencionada MTBSTFA y la N, O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA)¹³². Para seleccionar el reactivo derivatizante, se añadió 10 µL de cada reactivo a 90 µL de una solución que contiene 40 ng·mL⁻¹ de cada analito testado, siendo la acetona medio de la disolución-. La reacción fue incubada a 70°C durante 30 minutos¹³⁰.

Los mejores resultados fueron obtenidos con MTBSTFA. Este derivatizante permitió obtener buena sensibilidad y resolución para todos los analitos estudiados permitiendo su determinación a las concentraciones medioambientales. En el caso de BSTFA, se detectaron señales más bajas para todos los analitos testados. Por tanto, el reactivo MTBSTFA se seleccionó como derivatizante para este trabajo.

Una vez elegido el reactivo más adecuado se estudió la concentración y tiempo de derivatización óptimos. La concentración óptima de reactivo derivatizante también fue evaluada, para ello, se estudiaron diferentes proporciones de MTBSTFA: muestra, 10:90 y 20:80. En ambos casos, se obtuvieron resultados similares para ácido clofíbrico,

ibuprofeno y naproxeno, pero, en el caso de diclofenaco, se obtuvieron valores de área menores cuando se utilizó la proporción de 10:90. Por este motivo, los mejores resultados fueron obtenidos en el segundo caso, cuando se utilizó una proporción de 20 μL de MTBSTFA y 80 μL de muestra.

Otro de los parámetros a controlar en la reacción de derivatización es el tiempo de reacción. Acorde a la literatura, 30 minutos es el tiempo necesario para completar la reacción de derivatización usando MTBSTFA como reactivo. Sin embargo, en este trabajo, fueron estudiados otros tiempos: 30 minutos y 1 hora de reacción, manteniendo el extracto a una temperatura de 70°C. Para ello, se adicionó 20 μL de MTBSTFA a 80 μL de una solución que contiene 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de cada fármaco. Las soluciones se prepararon de forma individual, estudiándose el efecto por separado para evitar efectos sinérgicos entre los compuestos y cada una de ellas se inyectó en el GC-MS bajo las condiciones descritas en secciones anteriores. Los resultados mostraron que tanto ácido clofíbrico, ibuprofeno como naproxeno presentaron áreas de pico similares para los dos tiempos de reacción estudiados. Sin embargo, en el caso de diclofenaco, la señal del mismo disminuyó considerablemente cuando el tiempo de reacción se aumentó a 1 hora (Ver **Figura III.7.**). Por este motivo, el tiempo de reacción óptimo seleccionado para este trabajo fue de 30 minutos.

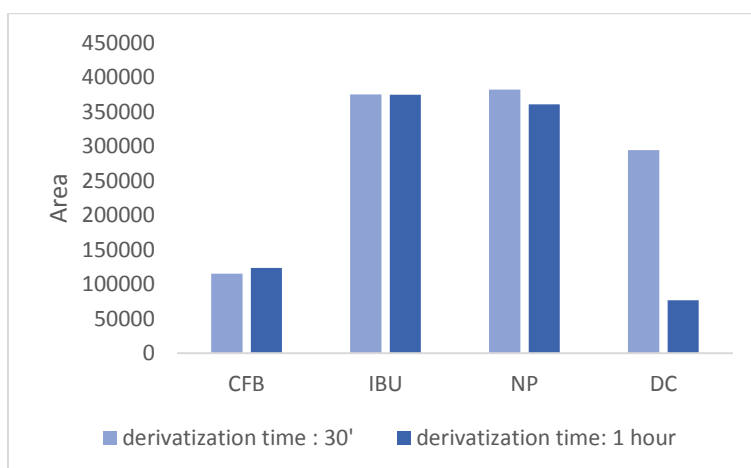


Figura III.7. Efecto del tiempo de derivatización usando MTBSTFA como agente derivatizante en el área de pico en una disolución de 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de cada fármaco.

Bajo todas las condiciones optimizadas se realizó la separación cromatográfica. La **Figura III.8.** muestra un cromatograma de una solución que contiene $10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ de todos los analitos estudiados como N-trimetilsilil derivados. Como puede observarse, todos los analitos se separan en un tiempo de cromatograma inferior a 22 minutos.

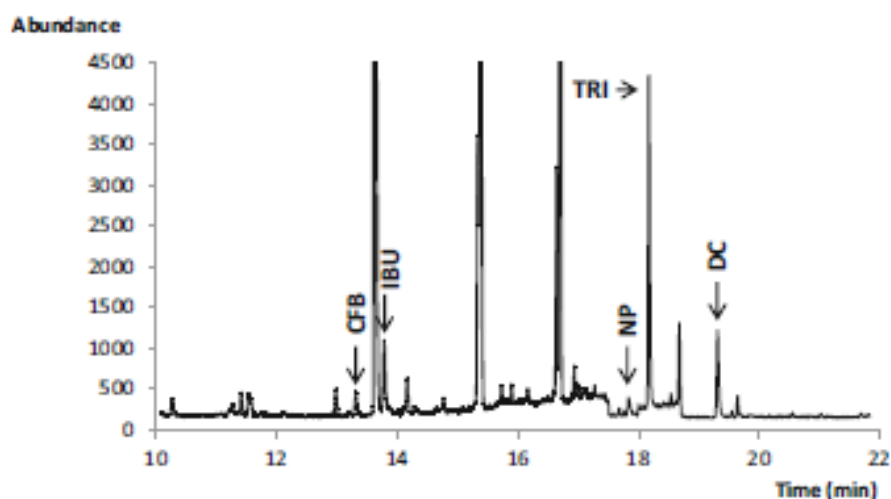


Figura III.8. Cromatograma SIM de una solución que contiene $10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ de todos los analitos estudiados como N-trimetilsilil derivados y triclosán como estándar interno.

III.3.3. Optimización del tratamiento de muestra

La preparación de muestra generalmente consta de dos etapas:

- Extracción de los analitos de la matriz de cada muestra con un disolvente orgánico.
- Habitualmente es necesario llevar a cabo una etapa de limpieza (*clean-up*) en los extractos de las muestras tratadas con el disolvente orgánico (en el caso de huevos de lumpo y larvas de pez cebra). Esta etapa permite reducir la presencia de interferencias y evita el efecto matriz en la cuantificación de los analitos.

III.3.3.1. Medios de cultivo

En el caso de los medios de cultivo, la extracción de los cuatro fármacos se llevó a cabo mediante una extracción líquido-líquido (LLE). Para ello, se evaluaron varios solventes, acetato de etilo, tolueno, hexano y mezclas de disolventes hexano/acetato de etilo en diferentes proporciones (50:50 y 25:75 v/v). Para ello, medios de cultivo (500 μL) tanto blancos como fortificados con 10 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ de cada analito y 30 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ de estándar interno (triclosán) se trataron con 1 mL de cada solvente seleccionado y los extractos fueron inyectados y analizados por CG-MS. La selección del disolvente se llevó a cabo basándose en los cálculos de las recuperaciones obtenidas. Los resultados se muestran en la **Tabla III.5**. Las recuperaciones se calcularon estableciendo la relación de área de pico del analito con respecto al área de pico del estándar interno.

Tabla III.5. Recuperaciones (%) obtenidas para cada analito testado en medios de cultivo (500 μL) fortificados con 10 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ de cada analito y 30 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ de estándar interno usando diferentes solventes de extracción (n = 3).

% R	Acetato de Etilo	Tolueno	Hexano	Hexano:Acetato de Etilo (1:1)	Hexano:Acetato de Etilo (1:3)
Ácido clofíbrico	100 \pm 10	84 \pm 16	n.d.	4 \pm 1	11 \pm 1
Ibuprofeno	98 \pm 2	73 \pm 6	n.d.	6 \pm 3	62 \pm 4
Naproxeno	111 \pm 4	114 \pm 14	n.d.	8 \pm 1	52 \pm 7
Diclofenaco	114 \pm 7	111 \pm 3	n.d.	11 \pm 3	87 \pm 6

Los mejores resultados fueron obtenidos con acetato de etilo, como se observa en la **Tabla III.5**. Los extractos de los medios de cultivo analizados empleando acetato de etilo como extractante dieron lugar a cromatogramas más limpios con % de recuperación más elevados. Una segunda extracción fue llevada a cabo pero las recuperaciones obtenidas en esta segunda etapa fueron inferiores al 7% para todos los analitos. Por esta razón, una única etapa de extracción fue establecida para la determinación de los cuatro analitos.

III.3.3.2. Huevas de lumpo

La extracción de los analitos en huevas de lumpo se realizó con una sonda de ultrasonidos (USP). Se evaluaron diferentes solventes: hexano, acetato de etilo, acetonitrilo, acetonitrilo/ácido cítrico 0.1M y ácido acético/acetonitrilo (1:99 v/v). Estos extractantes fueron elegidos acorde a la literatura existente¹⁴¹⁻¹⁴².

Las condiciones de extracción se han optimizado basándose en estudios realizados en trabajos previos del grupo de investigación: 40% como amplitud de la sonda de ultrasonidos y tiempo de extracción de 1 minuto a temperatura ambiente^{78,143}. Para evaluar los diferentes disolventes orgánicos, 10 mg de huevas de lumpo fueron fortificadas con una disolución conjunta de los cuatro analitos (300 ng·g⁻¹ de cada uno de ellos) y una disolución del estándar interno. Los resultados obtenidos de las recuperaciones calculadas para cada fármaco se muestran en la **Tabla III.6**.

Tabla III.6. Recuperaciones (%) obtenidas para cada analito testado en huevas de lumpo (10 mg) fortificados con 300 ng·g⁻¹ de cada analito y estándar interno usando diferentes solventes de extracción (n = 3).

% R	AcN	AcN/Ácido cítrico 0.1M	AcN/Ácido acético 1%	Hexano	AcOEt
Ácido Clofibrato	105 ± 8	84 ± 4	107 ± 6	15 ± 2	12 ± 3
Ibuprofeno	104 ± 7	101 ± 7	79 ± 3	9 ± 1	13 ± 1
Naproxeno	103 ± 11	92 ± 4	77 ± 8	8 ± 1	17 ± 3
Diclofenaco	114 ± 17	107 ± 3	83 ± 12	12 ± 3	16 ± 4

Las recuperaciones obtenidas para los cuatro analitos cuando se usa hexano y acetato de etilo como disolvente de extracción fueron muy bajas. Sin embargo, cuando se usa AcN y AcN/Ácido cítrico 0.1M, las recuperaciones fueron más altas, además, los cromatogramas obtenidos con este último solvente fueron muy limpios. Todos los resultados fueron obtenidos considerando la relación de área entre el analito de interés y el estándar interno. La evaluación de los diferentes disolventes se llevó a cabo empleando C₁₈ como sorbente en la etapa de limpieza. Finalmente, se seleccionó acetonitrilo como disolvente de extracción óptimo por las mayores recuperaciones obtenidas y el menor número de

interferencias conseguidas, en comparación con el cromatograma obtenido usando AcN/Ácido cítrico 0.1M.

Finalmente, para concluir con el desarrollo del método analítico, fue necesario optimizar la etapa de limpieza o *clean-up* con el objetivo de extraer el contenido lipídico presente en la matriz (normalmente, el contenido graso en larvas de pez cebra es aproximadamente un 15% del peso húmedo). Para este propósito, y dado el peso de muestra tratado, y según la bibliografía, la mejor estrategia para la eliminación del contenido lipídico es mediante un procedimiento de extracción en fase sólida dispersiva^{132, 141, 144-147}. Se evaluaron varios sorbentes comerciales: C₁₈, PSA, Florisil y un polímero de impronta molecular (MIP) comercial (Affinilute MIP), así como combinaciones diferentes de los sorbentes mencionados.

Para evaluar el sorbente adecuado, 10 mg de huevos de lumpo se fortificaron a un nivel de concentración de 300 ng·g⁻¹ de cada fármaco y 300 ng·g⁻¹ de estándar interno. Paralelamente se analizaron muestras blanco de huevos de lumpo. Todos los analitos se extrajeron con acetonitrilo, acorde al procedimiento esquematizado en sección III.2. Los resultados mostraron una limpieza efectiva para los blancos en el caso de emplear Florisil, no existiendo interferencias a los tiempos de retención de los analitos de interés pero en el caso de las muestras fortificadas se obtuvieron recuperaciones muy bajas. En el caso del PSA, los analitos quedaron retenidos en el mismo, por lo que fue descartado del estudio. Sin embargo, cuando se utilizó C₁₈ como sorbente, las recuperaciones obtenidas fueron próximas al 100% y los cromatogramas de los blancos no mostraron interferencias. Finalmente, cuando se empleó un MIP comercial y se aplicó el procedimiento descrito, las áreas asociadas a los picos cromatográficos fueron muy variables, por lo que este sorbente también fue rechazado. En el caso de las combinaciones entre C₁₈, PSA y Florisil, los resultados no mejoraron significativamente, por lo que tampoco se consideraron. La **Tabla III.7.** muestra los valores de recuperación obtenidos para los dos sorbentes testados que mejores recuperaciones dieron en los extractos de lumpo fortificados con los cuatro fármacos.

Tabla III.7. Recuperaciones (%) obtenidas para cada analito testado en huevas de lumpo (10 mg) fortificadas con 300 ng·g⁻¹ de cada analito y estándar interno, usando diferentes sorbentes (n = 3).

% R	C ₁₈	Florisil
Ácido clofíbrico	105 ± 6	37 ± 4
Ibuprofeno	107 ± 3	36 ± 7
Naproxeno	92 ± 9	30 ± 5
Diclofenaco	107 ± 5	82 ± 11

A la vista de los resultados mostrados en **Tabla III.7.**, el sorbente C₁₈ fue seleccionado como sorbente de limpieza óptimo, tanto por los valores de recuperación próximos al 100% obtenidos en todos los casos, así como por la efectividad de la limpieza llevada a cabo sobre el extracto de la muestra, permitiendo obtener cromatogramas en ausencia de interferencias a los t_R de interés.

III.3.3.3. Larvas de pez cebra

El método propuesto en huevas de lumpo fue aplicado a la determinación de ácido clofíbrico, ibuprofeno, naproxeno y diclofenaco en larvas de pez cebra. Para ello, se preparan muestras control, (en ausencia de contaminantes, constituidas por 15-20 larvas con un peso húmedo entre 8-10 mg) y muestras fortificadas a un nivel de concentración de 300 ng·g⁻¹ de cada analito y 300 ng·g⁻¹ de triclosán. Los resultados mostraron la efectividad del método propuesto y no se observaron picos interferentes en los cromatogramas a los tiempos de retención de los cuatro compuestos testados. En la **Tabla III.8.** se muestran los valores de recuperación obtenidos para ácido clofíbrico, ibuprofeno, naproxeno y diclofenaco en larvas de pez cebra aplicando el método propuesto.

Tabla III.8. Recuperaciones (%) obtenidas para cada analito testado en larvas de pez cebra (10 mg) fortificadas con 300 ng·g⁻¹ de cada analito y 300 ng·g⁻¹ de estándar interno (n = 3).

FÁRMACO	% R
Ácido clofbrico	99 ± 2
Ibuprofeno	102 ± 5
Naproxeno	93 ± 7
Diclofenaco	101 ± 4

III.3.4. Validación del método analítico propuesto

Los métodos analíticos propuestos se evalúan en términos de linealidad, precisión, recuperación y límites de detección y de cuantificación en diferentes muestras estudiadas: medio de cultivo, huevos de lumpo comercial y larvas de pez cebra.

- Linealidad y efecto matriz:

Como se ha mencionado, el efecto matriz se evaluó mediante un calibrado externo utilizando patrón interno así como mediante un calibrado en presencia de la matriz de las diferentes muestras: medios de cultivo, huevos de lumpo y larvas de pez cebra, lo que permitió estimar la presencia de efecto matriz por comparación estadística de las pendientes de ambos calibrados. Para ello, los analitos se extraen con los métodos descritos en las **Figuras III.1., III.2. y III.3.** Una vez inyectados los extractos en el cromatógrafo, se representan la relación área analito de interés/ área del estándar interno en función de la concentración del analito y se comparan estadísticamente las correspondientes pendientes. Se observó efecto matriz en la cuantificación de los cuatro fármacos estudiados en huevos de lumpo y larvas de pez cebra (**Tabla III.9, Tabla III.10 y Tabla III.11**).

Tabla III.9. Evaluación del efecto matriz a través de la comparación de pendientes entre el calibrado externo y calibrado en presencia de la matriz para cada analito estudiado en medios de cultivo.

FÁRMACO	Pendiente calibrado externo	Pendiente calibrado sobre matriz
Ácido clofíbrico	0.32	0.12
Ibuprofeno	0.87	0.50
Naproxeno	0.56	0.15
Diclofenaco	0.82	0.26

Tabla III.10. Evaluación del efecto matriz a través de la comparación de pendientes entre el calibrado externo y calibrado en presencia de la matriz para cada analito estudiado en huevas de lumpo.

FÁRMACO	Pendiente calibrado externo	Pendiente calibrado sobre matriz
Ácido clofíbrico	0.99	0.56
Ibuprofeno	0.47	0.37
Naproxeno	0.79	0.58
Diclofenaco	1.03	0.12

Tabla III.11. Evaluación del efecto matriz a través de la comparación de pendientes entre el calibrado externo y calibrado en presencia de la matriz para cada analito estudiado en larvas de pez cebra.

FÁRMACO	Pendiente calibrado externo	Pendiente calibrado sobre matriz
Ácido clofíbrico	0.33	0.23
Ibuprofeno	0.40	0.41
Naproxeno	0.53	0.17
Diclofenaco	0.65	0.22

A la vista de los resultados obtenidos se realizaron calibrados preparados a partir de muestras dopadas con los cuatro fármacos a nueve concentraciones en el intervalo comprendido entre 0-1000 ng·mL⁻¹. Los analitos se añadieron antes y después de la extracción, con objeto de poder calcular la recuperación de cada analito. Los calibrados en presencia de la matriz se prepararon diariamente de la siguiente forma: blancos de lumpo y larvas de pez cebra fortificados entre 10-1500 ng·g⁻¹ de cada analito y 300 ng·g⁻¹ de triclosan como estándar interno y medios de cultivo fortificados entre 5-200 ng·mL⁻¹

de cada analito con $30 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ de triclosán. Los coeficientes de linealidad obtenidos para todos los analitos estudiados fueron $r^2 > 0.995$.

- Límites de detección y cuantificación:

Se calcularon los límites de detección (LODs) y límites de cuantificación (LOQs) para cada analito a partir de las curvas de calibración y de la desviación estándar de la concentración mínima en la que se ha llevado a cabo el calibrado ($3s$ y $10s$ para LOD y LOQ, respectivamente): $10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ en muestras acuosas y $100 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ en huevos de lumpo y larvas de pez cebra. Los valores de LOD obtenidos fueron entre $0,1\text{-}1,9 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, $13\text{-}26 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ y $3\text{-}15 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ en medios de cultivo, huevos de lumpo y larvas de pez cebra, respectivamente. Los valores de LOQ estuvieron comprendidos entre $0,4\text{-}6,3 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, $43\text{-}86 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ y $10\text{-}51 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ en medios de cultivo, huevos de lumpo y larvas de pez cebra, respectivamente.

- Precisión y recuperación:

Los valores de precisión y de recuperación obtenidos para los ensayos analizados en el mismo día y en días diferentes se muestran en la **Tabla III.12** y **Tabla III.13**.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla III.12. Valores de precisión (%RSD) y recuperación en diferentes días obtenidos para cada analito testado en medios de cultivo, huevos de lumpo (10 mg) y larvas de pez cebra fortificadas a dos niveles de concentración de los cuatro analitos y estándar interno.

Precisión (diferentes días)								
Medios de cultivo	10 ng·mL ⁻¹				50 ng·mL ⁻¹			
	CFB	IBU	NP	DC	CFB	IBU	NP	DC
Concentración obtenida (ng·mL ⁻¹)	9.5 ± 0.3	10.2 ± 0.8	9.2 ± 0.9	10.2 ± 0.7	47 ± 2	48.6 ± 0.9	50 ± 4	52 ± 3
RSD, %	3%	5%	2%	4%	6%	3%	10%	8%
%R	95 ± 3	102 ± 8	92 ± 9	102 ± 7	94 ± 5	97 ± 2	101 ± 9	103 ± 6
Huevas de lumpo	200 ng g ⁻¹				500 ng g ⁻¹			
	CFB	IBU	NP	DC	CFB	IBU	NP	DC
Concentración obtenida (ng·g ⁻¹)	194 ± 4	208 ± 2	192 ± 14	190 ± 10	470 ± 20	455 ± 10	500 ± 15	505 ± 15
RSD, %	1%	4%	5%	5%	2%	7%	8%	3%
%R	97 ± 2	104 ± 1	96 ± 7	95 ± 5	94 ± 4	91 ± 2	100 ± 3	101 ± 3
Larvas de pez cebra	200 ng g ⁻¹							
	CFB	IBU	NP	DC				
Concentración obtenida (ng·g ⁻¹)	214 ± 4	212 ± 10	206 ± 2	194 ± 4				
RSD, %	3%	1%	6%	2%				
%R	107 ± 2	106 ± 5	103 ± 1	97 ± 2				

Tabla III.13. Valores de precisión (%RSD) y recuperación (entre días) obtenidos para cada analito testado en medios de cultivo, huevos de lumpo (10 mg) y larvas de pez cebra fortificadas a dos niveles de concentración de los cuatro analitos y estándar interno.

Precisión entre días								
Medios de cultivo	10 ng mL ⁻¹				50 ng mL ⁻¹			
	CFB	IBU	NP	DC	CFB	IBU	NP	DC
Concentración obtenida (ng·mL ⁻¹)	9.72 ± 0.09	9.9 ± 0.4	9.6 ± 0.7	10.4 ± 0.7	47 ± 1	49 ± 1	51 ± 2	50 ± 2
RSD, %	4%	3%	8%	1%	1%	3%	6%	5%
%R	97 ± 1	99 ± 4	96 ± 7	104 ± 7	95 ± 3	98 ± 3	103 ± 5	101 ± 4
Huevas de lumpo	200 ng g ⁻¹				500 ng g ⁻¹			
	CFB	IBU	NP	DC	CFB	IBU	NP	DC
Concentración obtenida (ng·g ⁻¹)	184 ± 8	194 ± 4	186 ± 8	206 ± 12	505 ± 10	480 ± 20	490 ± 35	525 ± 35
RSD, %	2%	2%	5%	4%	1%	2%	7%	2%
%R	92 ± 4	97 ± 2	93 ± 4	103 ± 6	101 ± 2	96 ± 4	98 ± 7	105 ± 7
Larvas de pez cebra	200 ng g ⁻¹							
	CFB	IBU	NP	DC				
Concentración obtenida (ng·g ⁻¹)	202 ± 2	204 ± 8	198 ± 8	204 ± 6				
RSD, %	1%	3%	5%	3%				
%R	101 ± 1	102 ± 4	99 ± 4	102 ± 3				

III.3.5. Ensayos de bioacumulación

El método propuesto fue aplicado a la determinación del potencial de bioacumulación de cada analito en larvas de pez cebra. Para ello, se llevaron a cabo ensayos de bioacumulación como se describe en la sección *III.1. Instrumentación, reactivos y muestras*.

III.3.5.1. Medios de cultivo

Se analizaron medios de cultivo de las larvas de pez cebra a diferentes tiempos de exposición a los fármacos para controlar la estabilidad de los mismos y determinar el contenido de ácido clofíbrico, ibuprofeno, naproxeno y diclofenaco, lo que permitiría establecer los factores de bioacumulación. Los ensayos de bioacumulación se llevaron a cabo a dos niveles de concentración de cada analito, 10 y 50 ng·mL⁻¹. A 10 ng·mL⁻¹, la concentración de cada compuesto permaneció constante durante las 48 horas del período de absorción del ensayo. Sin embargo, a 50 ng·mL⁻¹, se observó una clara disminución en la concentración de todos los fármacos testados después de 6 horas de exposición. Sin embargo, a 24 horas la concentración de los analitos aumentó considerablemente y permaneció constante durante el tiempo posterior. La **Tabla III.14.** muestra los resultados obtenidos para cada analito testado en los medios de exposición durante la fase de absorción (0, 6, 24, 43 y 48 horas) y la fase de depuración (50, 53, 56 y 74 horas) a ambas concentraciones. Los resultados obtenidos están en consonancia con la aplicación del test 305 propuesto por la OECD, el cual requiere que la concentración de los analitos permanezca constante en el medio de exposición. Además, las soluciones control y las soluciones correspondientes a la fase de depuración fueron analizadas mediante CG-MS y no se observó ningún pico cromatográfico coincidente con el tiempo de retención de los analitos evaluados.

Tabla III.14. Concentración nominal obtenida de cada analito testado en los medios de exposición durante la fase de absorción (0, 6, 24, 43 y 48 horas) y fase de depuración (50, 53, 56 y 74 horas a la concentración de 10 y 50 ng·mL⁻¹.

	Tiempo (horas)	Concentración nominal 10 ng·mL ⁻¹				Concentración nominal 50 ng·mL ⁻¹			
		[CFB]	[IBU]	[NP]	[DC]	[CFB]	[IBU]	[NP]	[DC]
Fase de absorción	0	9 ± 2	10 ± 2	7 ± 1	10 ± 5	13 ± 2	14 ± 6	19.4 ± 0.3	23 ± 6
	6	10 ± 1	13 ± 3	9 ± 2	11 ± 1	15 ± 9	8 ± 6	9.6 ± 0.4	8 ± 3
	24	10 ± 2	11 ± 4	8 ± 1	12 ± 5	30 ± 2	35 ± 4	35 ± 1	32 ± 7
	45	9 ± 4	9 ± 2	8 ± 2	10 ± 3	27 ± 7	43 ± 3	33 ± 0.5	39 ± 8
	48	7 ± 4	9 ± 3	8 ± 3	10 ± 1	32 ± 7	35 ± 4	42 ± 1	48 ± 10
Fase de depuración	50	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	54	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	69	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	72	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

III.3.5.2. Larvas de pez cebra

Las larvas de pez cebra fueron expuestas a los diferentes fármacos según se describe en la sección III.1. y se analizaron a diferentes tiempos de exposición tal y como se expone en la sección III.2 para la determinación de la concentración de ácido clofíbrico, ibuprofeno, naproxeno y diclofenaco presente en cada muestra. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla III.15**.

Tabla III.15. Concentración nominal obtenida de cada analito testado en larvas de pez cebra durante la fase de absorción (0, 6, 24, 43 y 48 horas) y fase de depuración (50, 53, 56 y 74 horas expuestas a los cuatro analitos de interés a la concentración de 10 y 50 ng·mL⁻¹.

	Tiempo (horas)	Concentración nominal 10 ng·mL ⁻¹				Concentración nominal 50 ng·mL ⁻¹			
		[CFB]	[IBU]	[NP]	[DC]	[CFB]	[IBU]	[NP]	[DC]
Fase de absorción	0	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	6	34 ± 20	20 ± 2	66 ± 47	100 ± 57	34 ± 15	27 ± 27	67 ± 13	66 ± 6
	24	69 ± 4	43 ± 40	65 ± 56	87 ± 7	39 ± 13	26 ± 28	51 ± 3	55 ± 11
	45	67 ± 17	44 ± 4	96 ± 87	63 ± 23	43 ± 10	29 ± 26	45 ± 2	54 ± 13
	48	63 ± 2	43 ± 22	135 ± 17	76 ± 13	42 ± 7	31 ± 19	49 ± 1	57 ± 12
Fase de depuración	50	45 ± 14	63 ± 18	42 ± 3	56 ± 10	47 ± 12	63 ± 18	42 ± 3	56 ± 10
	54	49 ± 16	29 ± 27	41 ± 4	50 ± 14	40 ± 15	29 ± 27	41 ± 4	50 ± 14
	69	44 ± 8	27 ± 28	58 ± 7	48 ± 15	45 ± 7	27 ± 28	58 ± 7	48 ± 15
	72	42 ± 12	20 ± 24	40 ± 5	50 ± 15	43 ± 10	20 ± 24	40 ± 5	50 ± 15

Los resultados obtenidos a ambas concentraciones mostraron unos valores de bioacumulación muy bajos para todos los analitos estudiados. La **Figura III.9.**, muestra el cromatograma obtenido para una muestra de larva analizadas por GC-MS expuestas a 48 horas a la concentración de $50 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ de ácido clofíbrico, ibuprofeno, naproxeno y diclofenaco en comparación con una muestra fortificada con $20 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ de cada analito.

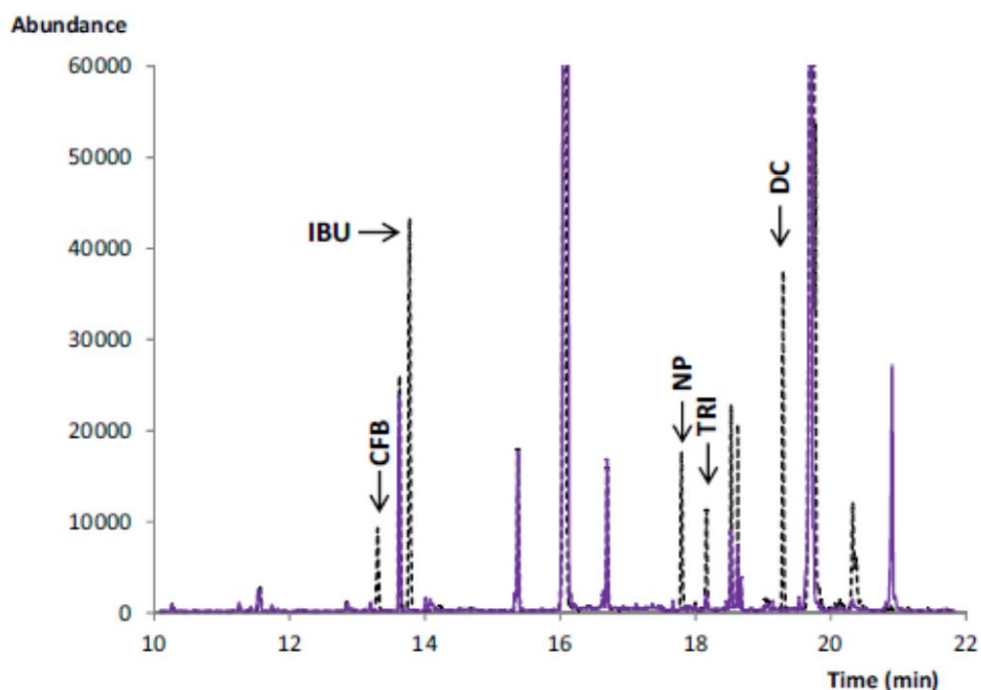


Figura III.9. Cromatograma obtenido por GC-MS de una muestra de larvas de pez cebra (10 mg) expuestas durante 48 horas a $50 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ de CFB, IBU, NP y DC (en azul) y larvas fortificadas con $20 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ de cada compuesto (en negro discontinuo).

Como se observa en la **Figura III.9.**, los cuatro analitos son identificados adecuadamente mediante el método propuesto. Acorde a estos resultados, los cromatogramas obtenidos muestran que a un tiempo de absorción de 48 horas no se observa un área significativa de ningún analito en las larvas analizadas indicativo de bioacumulación importante por comparación del cromatograma correspondiente a una muestra de larvas fortificadas a una concentración de $20 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$.

III.3.5.3. Factores de bioacumulación

Los factores de bioacumulación de cada fármaco se calcularon a partir de los experimentos llevados a cabo en el presente trabajo, ajustada la correspondiente curva cinética de variación de la concentración en función del tiempo a un modelo de primer orden (**Figura III.10 a Figura III.14**)⁴³. Utilizando estos modelos y ajustando los datos experimentales obtenidos a las ecuaciones presentadas en la introducción (*ecuaciones 1.6 y 1.7*), los factores de bioacumulación obtenidos fueron: 7,4 y 2,3 para ácido clofibrico, 4,9 y 1,1 para ibuprofeno, 9,3 y 1,9 para naproxeno y 7,9 y 2,0 para diclofenaco para concentraciones nominales, de 10 y 50 ng·mL⁻¹, respectivamente, lo que indica como se ha indicado un potencial de bioacumulación bajo para los cuatro fármacos estudiados.

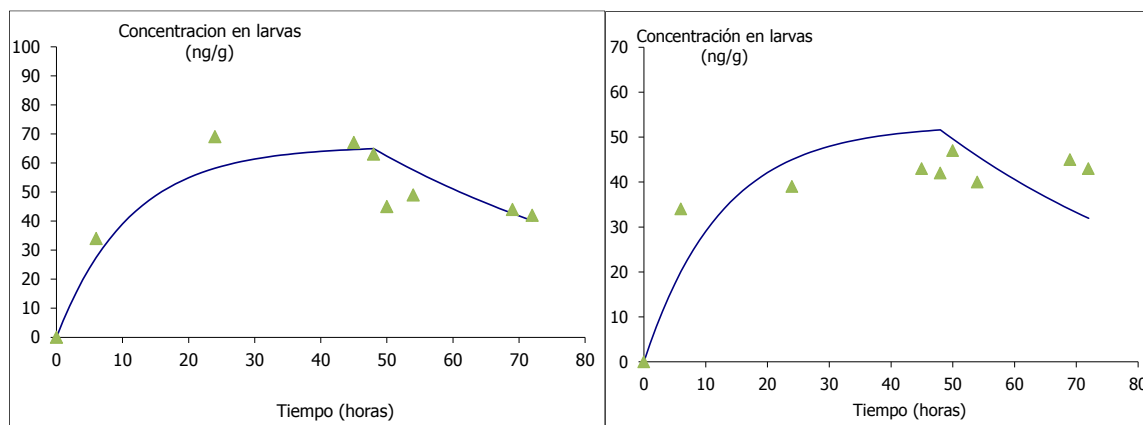


Figura III.10. Variación de la concentración media encontrada en los ensayos de bioacumulación en larvas de pez cebra expuestas a la concentración de ácido clofibrico 10 ng·mL⁻¹ y 50 ng·mL⁻¹.

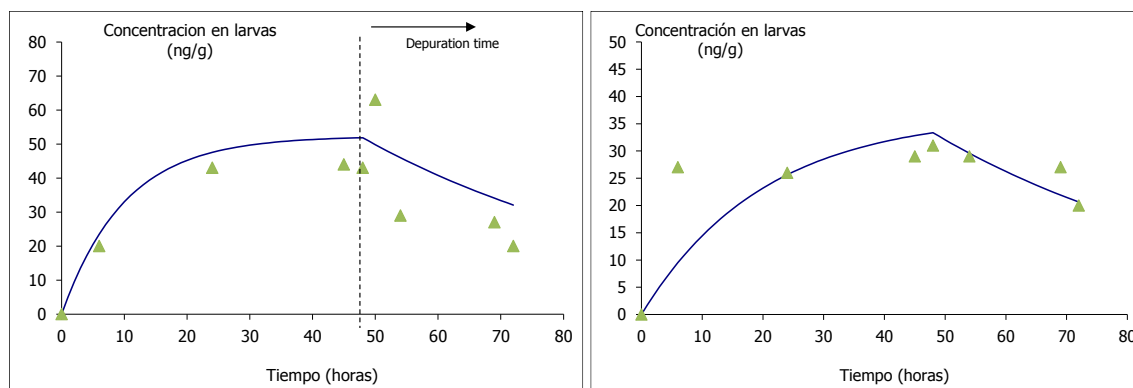


Figura III.11. Variación de la concentración media encontrada en los ensayos de bioacumulación en larvas de pez cebra expuestas a la concentración de ibuprofeno a 10 ng·mL⁻¹ y 50 ng·mL⁻¹.

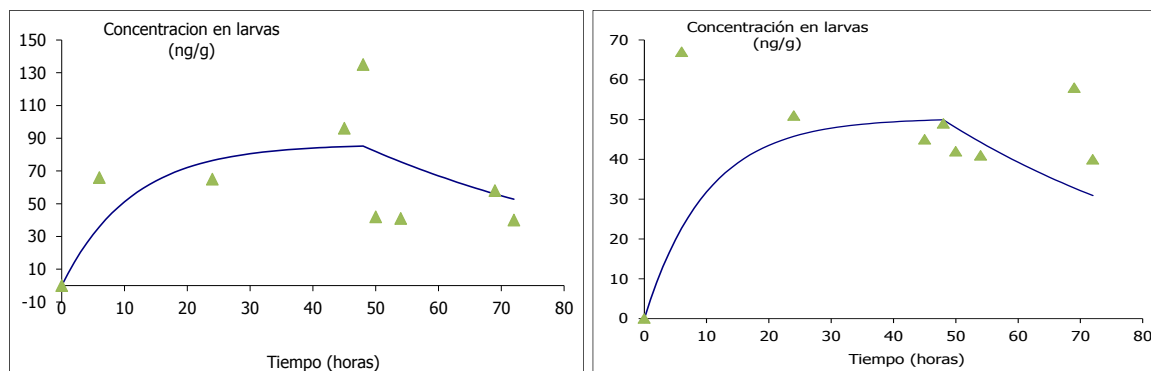


Figura III.12. Variación de la concentración media encontrada en los ensayos de bioacumulación en larvas de pez cebra expuestas a la concentración de naproxeno a $10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ y $50 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$.

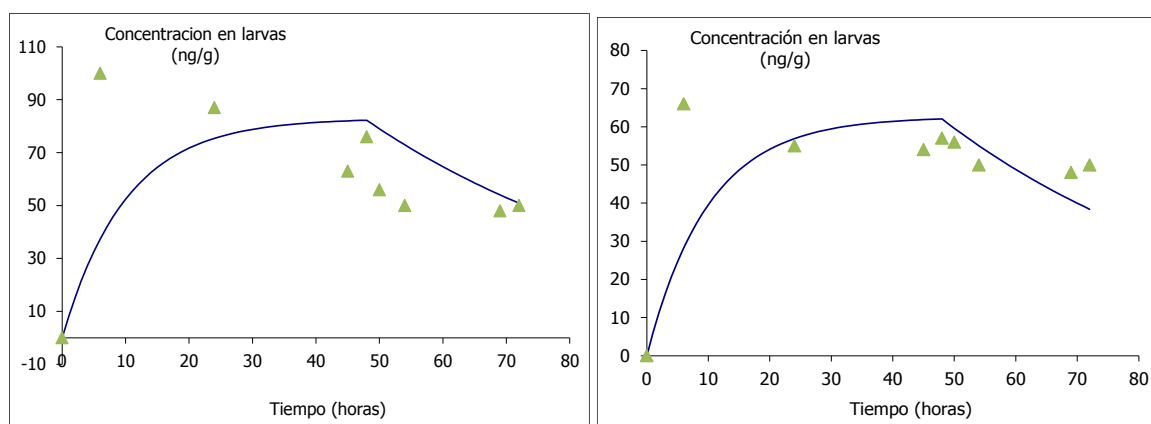


Figura III.13. Variación de la concentración media encontrada en los ensayos de bioacumulación en larvas de pez cebra expuestas a la concentración de diclofenaco a $10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ y $50 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Acorde a la OECD, el principal criterio de acumulación viene definido por el valor del parámetro $\log K_{ow} > 3$, parámetro que manifiesta la tendencia de acumulación, lo cual es el caso de tres de los cuatro compuestos estudiados y, únicamente ácido clofibrico, presenta un valor muy bajo de $\log K_{ow}$ ⁵³. Este criterio puede ser erróneo cuando se trata de compuestos iónicos. Otros modelos más sofisticados como el propuesto por Arnot y Gobas⁴⁴ que usan la aproximación QSAR, en la que establece los valores de $\log K_{ow}$ y un número de factores de corrección pero no considera los parámetros relacionados con el peso molecular químico ni el tamaño de la sustancia química estudiada, o modificaciones del modelo utilizado en el cálculo de los factores de corrección introduciendo procesos de biotransformación que parecen sobreestimar los valores de BCF muy probablemente asociado al valor de pK_a de los fármacos estudiados ($pK_a < 5$) lo que haría que estuviesen ionizados (pH aproximado del medio de exposición ~ 7.5)¹⁴⁸ (**Tabla III.16.**). Este aspecto

resulta un componente importante en el modelo que generalmente sobreestima los BCF para ácido clofíbrico, ibuprofeno, naproxeno y diclofenaco ya que la bioconcentración de las especies iónicas muestran una bioconcentración típica menor que la de los compuestos no ionizados¹⁴⁹. Los resultados obtenidos por otros investigadores están de acuerdo con los resultados de este estudio, obteniendo valores bajos de los factores de bioacumulación (0.08-1.4) en estudios llevados a cabo en pez gordo (*Pimephales promelas*) y pez gato (*Ictalurus punctatus*) con ibuprofeno utilizando una concentración de 250 ng·mL⁻¹ durante 28 días de exposición y 14 días de depuración¹⁵⁰.

Tabla III.16. Datos de bioacumulación de los fármacos estudiados*.

	BCF									
	Estimated			Experimental						
	Arnot and Gobas 2006	Arnot et al. 2008	EPI Suite BCFWIN™ 2012	Brozinski et al. 2013 ¹⁵¹	Brown et al. 2007 ¹⁴⁹	Schwaiger et al. 2004 ¹⁵²	Wang and Gardinali (2013) ¹⁵³	Tanoue et al. (2014) ¹⁵⁴	Lathi et al. (2011) ¹⁵⁵	Este trabajo
				Bilis	Plasma sanguíneo	Músculo	Músculo	Plasma	Plasma	larvas
Ácido clofíbrico	40,5	25,5	3,16	-	-	-	-	<0,1	-	2,3-7,4
Ibuprofeno	967,4	400,2	3,16	500-1200	9	-	28	19	3,3-4,3	1,1-4,9
Naproxeno	3107	1329	3,16	75-1285	4	-	-	-	1,6-1,9	1,9-9,3
Diclofenaco	161,9	94,3	3,16	50-1213	7	0,4-50		4,2	4,9-5,7	2,0-7,9

Otros autores indican que las tasas de absorción química cambian solo levemente para los ácidos débiles en los peces, principalmente debido a la reducción del pH en la superficie de las branquias y al hecho de que las moléculas ionizadas pueden contribuir a la captación debido a que se produce un gradiente importante de moléculas a través de las membranas¹⁵⁶. Sin embargo, esta declaración no encaja muy bien con los datos experimentales obtenidos en este y otros estudios.

El software EPI Suite de la Agencia de Protección Ambiental de EE.UU. (EPI Suite BCFWIN™, 2012) utiliza el programa BCFBAF, basado en el modelo Arnot-Gobas⁴⁴. Este sistema tiene en cuenta el valor de Dow (la corrección de K_{ow} para la fracción de la forma neutral para compuestos orgánicos ionizables, IOC), y así las predicciones son mucho más cercanas a los valores experimentales (**Tabla III.16**) y hace de esta metodología de predicción una herramienta muy sencilla para estimar los valores reales. Otro estudio indica que los BCF de diclofenaco, naproxeno e ibuprofeno en la bilis¹⁵¹ son aproximadamente 1000 veces más altos que otros valores; es evidente que la bilis es un

órgano mucho más propenso a la bioacumulación y no es muy representativo de la carga corporal total, pero se puede utilizar para fines de detección.

Otro aspecto a tener en cuenta es la posible metabolización de estos fármacos y el comportamiento ambiental de los metabolitos. Algunos estudios han demostrado la presencia de metabolitos en concentraciones superiores a la de los compuestos parentales no metabolizados en truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) expuestas durante 10 días a una mezcla de 5 productos farmacéuticos como diclofenaco, naproxeno, ibuprofeno, bisoprolol y carbamazepina¹⁵⁵. Ortiz de García et al. publicó que un estudio basado en QSAR llevado a cabo para estudiar los posibles efectos adversos de 96 Pharmaceuticals and Personal Care Products (PPCP) y metabolitos así como una clasificación basada en la preocupación que presentan, mostró que un alto número de compuestos metabolizados tienen una puntuación de preocupación igual o superior a la de sus compuestos parentales¹⁵⁷.

**Determinación de residuos farmacéuticos en
alimentos y muestras medioambientales.
Evaluación de su toxicidad con larvas de pez
cebra.**

**IV. Determinación de SSRI y sus
metabolitos en muestras medioambientales y
alimentarias. Evaluación del potencial de
bioacumulación en larvas de pez cebra.**

En este capítulo se describe el desarrollo de una metodología analítica que permite determinar antidepresivos SSRI (inhibidores de la recaptación de serotonina) como fluoxetina, sertralina, citalpram y paroxetina así como sus principales metabolitos (norfluoxetina, norsertralina y desmetilcitalopram). Determinación del potencial de bioacumulación de cada analito y sus metabolitos en larvas de pez cebra.

IV.1. INSTRUMENTACIÓN, REACTIVOS Y MUESTRAS

El desarrollo de este método analítico requiere optimizar una etapa de extracción de los analitos, una etapa de limpieza o clean-up y una etapa de análisis mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

IV.1.1. Instrumentación

El proceso de extracción, de los diferentes antidepresivos se realizó con una sonda de ultrasonidos Vibra Cell (VCx130), provista de una punta de titanio de 2 mm de diámetro y generador de alta frecuencia de 130W a 20 KHz. Para la limpieza de los extractos o etapa de clean-up se utiliza un vórtex Genie-2 (Scientific Industries) y una microcentrifuga modelo 5415R (Eppendorf). La evaporación del disolvente de los diferentes extractos se llevó a cabo empleando una caja de vacío acoplada a una bomba de vacío modelo N035AN.18 en la que se emplea N₂ (N₂ técnico X50S) y un evaporador constituido por una caja de vacío de 20 posiciones (VacElut 20-place vaccum, Varian).

La separación y determinación de los analitos se lleva a cabo mediante análisis por cromatografía de gases, modelo 7890A (Agilent Technologies, Madrid, España), equipado con un inyector (autoinyector modelo HP 7683B Series) acoplado a un detector MSD de espectrometría de masas (detector HP 5975C VL MSD, Agilent Technologies, Madrid, España) dispuesto de un cuadrupolo como analizador de masas. El sistema GC-MS está equipado con una columna capilar de polidimetilsiloxano (95%) entrecruzada, ZB-5 (30 m x 0.25 mm I.D., 0.25 mm), de Phenomenex, usando helio (Pureza > 99.999%) a 1 mL·min⁻¹ como gas portador. Como software para el tratamiento de los resultados se utiliza el ChemStation de Agilent. Las condiciones instrumentales utilizadas en el desarrollo del método se incluyen en la **Tabla IV.1**.

Tabla IV.1. Condiciones instrumentales utilizadas en el sistema cromatográfico de GC-MS para determinar antidepressivos del tipo SSRI.

Tª de la fuente de iones	230°C
Tª Cuadrupolo	150°C
Tª línea de transferencia	280°C
Rango de masas (modo SCAN)	m/z 50-550

IV.1.2. Reactivos y soluciones estándar

Las soluciones de stock de cada fármaco testado fueron preparadas en metanol y almacenadas en oscuridad a -18°C protegidas de la luz. Las soluciones de trabajo se preparan diariamente por dilución a partir de la solución stock en el mismo disolvente, metanol. Las soluciones stocks son estables, al menos, durante 2 meses.

La **Tabla IV.2.** muestra los fármacos, reactivos (grado HPLC) y sorbentes utilizados en el desarrollo del método.

Tabla IV.2. Fármacos, reactivos y sorbentes empleados en el desarrollo del método analítico.

COMPUESTO	Fórmula empírica/ CASA COMERCIAL
Fluoxetine hydrochloride (FLX))	(±)-N-Methyl-γ-[4-(trifluoromethyl)phenoxy]benzenepropanamine hydrochloride (Sigma Aldrich)
Sertraline hydrochloride (SER)	(1S,4S)-4-(3,4-Dichlorophenyl)-1,2,3,4-tetrahydro-N-methyl-1-naphthalenamine hydrochloride (Sigma Aldrich)
Citalopram hydrobromide (CIT)	1-[3-(Dimethylamino)propyl]-1-(4-fluorophenyl)-1,3-dihydro-5-isobenzofurancarbonitrile hydrobromide (Sigma Aldrich)
Paroxetine hemihydrate (PAR)	(3S-trans)-3-[(1,3-Benzodioxol-5-yloxy)methyl]-4-(4-fluorophenyl)piperidine hydrochloride hemihydrate (Sigma Aldrich)
Norfluoxetine hydrochloride (NFLX)	(±)-γ-(4-Trifluoromethylphenoxy)benzenepropanamine hydrochloride (Sigma Aldrich)
Norsertraline hydrochloride solution (NSER)	(Sigma Aldrich)
Desmethylocitalopram hydrochloride solution (DCIT)	(Sigma Aldrich)
Fluoxetine D5 hydrochloride (FLX-d5)	(Sigma Aldrich)

Sertraline D3 hydrochloride solution (SER-d3)	(Sigma Aldrich)
Paroxetine D6 maleate solution (PAR-d6)	(Sigma Aldrich)
Heptafluorobutyric anhydride (HFBA)	Perfluorobutyric anhydride Sigma Aldrich
Heptafluorobutyric imidazole (HFBI)	1-(Perfluorobutyl)imidazole Sigma Aldrich
Acetonitrilo	(Scharlab)
Acetato de etilo (AcOEt)	(Lab-Scan)
Metanol (MeOH)	(Scharlab)
Tolueno	(Panreac)
Hexano	(Panreac)
Silica gel	(Agilent Technologies)
C₁₈	(Agilent Technologies)
PSA	(Agilent Technologies)
Graphitized carbon black (GCB)	(Sigma Aldrich)
Zsep	(Sigma Aldrich)
Florisil	(Sigma Aldrich)
Agua MilliQ	-

IV.1.3. Muestras y experimentos de bioacumulación con larvas de pez cebra

Para determinar el potencial de bioacumulación de antidepresivos SSRIs, es necesario desarrollar una metodología analítica que permita identificar y cuantificar fluoxetina, sertralina, paroxetina y citalopram y sus tres principales metabolitos, norfluoxetina, norsertralina y desmetilcitalopram en medios acuosos de cultivo, huevos de lumpo y, posteriormente, en larvas de pez cebra expuestas a estos contaminantes para determinar así el factor de bioacumulación de cada fármaco (BCF).

Inicialmente la optimización del método analito requiere el empleo de muestras comerciales, habiéndose seleccionado huevos comerciales de lumpo (*Cyclopterus lumpus*) (almacenadas en nevera a $5 \pm 3^\circ\text{C}$) procedentes de un supermercado de la localidad de Madrid. En el caso de los medios acuosos de cultivo, éstos se preparan de forma experimental manteniendo la concentración de sales estipulada en el en el test 305 de

bioconcentración, propuesto por la OECD en 2012 y en la ISO 7346-1 ($294.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ CaCl}_2\cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$; $123.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ MgSO}_4\cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$; $63.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{NaHCO}_3$; $5.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ KCl}$)^{53, 123}.

Las muestras de larvas de pez cebra de los experimentos de bioacumulación fueron obtenidas de peces adultos, criados y mantenidos en el Centro Tecnológico AZTI (REGA ES489010006105), en condiciones estándar¹²⁴. Los ensayos de bioacumulación se llevaron a cabo con larvas expuestas a los fármacos tras 72 h de la fertilización (hdf). En esta etapa de desarrollo y hasta las 120 horas tras la fertilización, no se consideran animales de laboratorio y pueden mantenerse sin alimentación durante otras 24 horas. Las larvas, se mantienen en el medio acuoso de sales antes mencionado (294 mg de $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $123,3 \text{ mg}$ de $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 63 mg de NaHCO_3 y $5,5 \text{ mg}$ de KCl en 1 L de agua destilada). Este medio de cultivo se utilizó como vía de exposición a los productos farmacéuticos testados en la presente Tesis Doctoral y es en este medio donde hay que determinar su contenido para calcular posteriormente el factor de bioacumulación de cada analito estudiado.

Los experimentos de bioacumulación con las larvas de pez cebra se llevan a cabo bajo las condiciones descritas. Las larvas de pez cebra se obtienen tras 72 horas post fecundación y exposición durante 48 horas a una mezcla de los cuatro fármacos parentales (fluoxetina, sertralina, paroxetina y citalopram) a dos niveles de concentración. Además, otro experimento similar fue llevado a cabo con larvas expuestas a una mezcla de los tres metabolitos (norfluoxetina, norsertralina y desmetilcitalopram). La concentración nominal de cada compuesto fue establecida en base al test 305 de la OECD⁵³. En esta guía se establece que la concentración de exposición debe ser el 1% y el 0.1% del valor LC_{50} de cada analito siempre que límite de detección del método permita su determinación. Los valores de LC_{50} que se han encontrado en la literatura, en el caso de fluoxetina son de 0.51 , 0.024 y $0.7 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en varias especies de crustáceos, algas y peces, respectivamente¹⁵⁸. Otros investigadores establecen valores de 0.12 , 3.9 y $0.58 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ para sertralina, citalopram y paroxetina en test llevados a cabo con crustáceos¹⁵⁹. En experimentos con peces (*P. promelas*) se estableció un valor de EC_{50} de $705 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para fluoxetina y valores de LC_{50} en ensayos a 48 horas de 212 , 198 y $216 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ dependiendo de su estequiometría (la mezcla racémica, el enantiomero R- y el S-, respectivamente)¹⁵⁸.

Dado que en la bibliografía se han encontrado una gran variabilidad y dispersión entre valores de LC_{50} , se han seleccionado los dos niveles de concentración para llevar a cabo los ensayos de bioacumulación basándose en los límites de detección del método desarrollado (extremo también recogido como posibilidad en la guía OCDE 305):

- a) En el caso de los compuestos parentales (fluoxetina, sertralina, paroxetina y citalopram), se seleccionan concentraciones de $300 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ y $80 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$.
- b) Como no se encontraron valores de LC_{50} para los tres metabolitos de interés, se establecen concentraciones similares a la de sus compuestos parentales acorde a los límites de detección y cuantificación del método desarrollado: $300 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ y $80 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ para desmetilcitalopram y, en el caso de norfluoxetina y norsertralina, los estudios de exposición se llevan a cabo a $100 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ y $50 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$.

En todos los ensayos de bioacumulación, los medios de exposición se actualizan cada 24 horas para asegurar que la concentración de exposición nominal permanece constante. Para cada ensayo, se recogen tres réplicas de muestras constituidas por 20 larvas del tanque a diferentes tiempos: 0, 6, 24, 45 y 48 horas y se almacenan en condiciones de ultracongelación hasta su análisis. La concentración de los analitos de interés se determina tanto en los medios de exposición como en las larvas expuestas recogidas a los diferentes tiempos durante todo el experimento.

IV.2. METODOLOGÍA ANALÍTICA

Para tratar los tres tipos diferentes de muestras (medio acuoso de exposición, huevos de pescado y larvas de pez cebra, es necesario desarrollar las metodologías analíticas para cada tipo de muestra que se describen a continuación.

IV.2.1. Medios de cultivo

En el caso de los medios de cultivo, se llevó a cabo una extracción líquido-líquido usando 1 mL de tolueno como disolvente de extracción. Para ello, 500 µL del medio de cultivo se extrae con 1000 µL de tolueno y se agita en vórtex durante 30 segundos. Previamente, se añadieron 8 ng de Paroxetine D6 maleato (Par-D6) a todas las muestras como estándar interno (SI). A continuación, la fase orgánica se separa de la fase acuosa y el contenido orgánico se evapora hasta sequedad bajo condiciones de vacío. Tras la etapa de evaporación, se añadieron 100 µL de HFBI para la derivatización de todos los analitos a 85°C durante 30 minutos. Posteriormente, se lleva a cabo una segunda extracción líquido-líquido añadiendo 500 µL de agua y 2 mL de tolueno para eliminar la cantidad de derivatizante en exceso y posibles interferencias de la matriz. Se transfiere el contenido orgánico a un vial de HPLC, se evapora hasta sequedad en condiciones de vacío y el extracto seco se redissuelve en 80 µL de tolueno. Finalmente, se inyecta 1 µL del extracto derivatizado y analiza por GC-MS en modo SIM. El esquema del procedimiento analítico descrito se describe en la **Figura IV.1**.

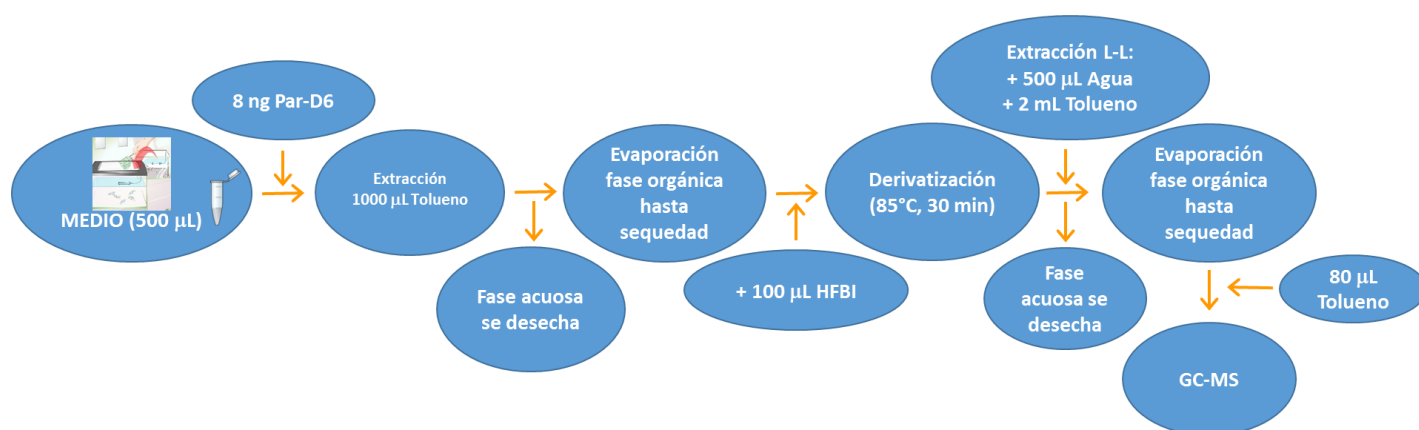


Figura IV.1. Esquema general del procedimiento analítico desarrollado para la determinación de fluoxetina, sertralina, citalopram, paroxetina y sus metabolitos (norfluoxetina, norsertralina y desmetilcitalopram) en medios de exposición mediante GC-MS.

VI.2.2. Huevas de lumpo

Aproximadamente 10 mg en peso húmedo de huevas de lumpo se fortificaron con una solución que contiene fluoxetina, sertralina, citalopram y paroxetina y sus metabolitos, norfluoxetina, norsertralina y desmetilcitalopram a una concentración de $240 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ y $100 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ de Par-D6 como IS. Las muestras fueron extraídas con 500 µL de acetonitrilo asistido con sonda de ultrasonidos durante 1 minuto y amplitud de 40%. El extracto fue centrifugado durante 15 minutos a 15°C y velocidad de centrifugación de 14 rcf. Estas condiciones se optimizaron en estudios previos del grupo de investigación^{76-78, 143}.

El residuo se desechó y el sobrenadante fue transferido a un eppendorf para proceder a su limpieza o clean-up, utilizando extracción en fase sólida dispersiva con C_{18} . Se adiciona 0.1 g de C_{18} al extracto de la muestra y se mezcla con ayuda de un vórtex durante 20 segundos para favorecer la extracción. A continuación, el extracto se centrifugó durante 15 minutos, a 15°C y 14 rcf como velocidad de centrifugación. El contenido orgánico se transfiere a un vial ámbar de HPLC de 4 mL con el objetivo de evaporar el extracto hasta sequedad en condiciones de vacío. Sobre el extracto seco, se añaden 100 µL de HFBI y la muestra se calienta a 85°C durante 30 minutos. Por último, se lleva a cabo una extracción líquido-líquido para eliminar el exceso de derivatizante y posibles interferencias. Para ello, se añadieron 500 µL de agua y 2 mL de tolueno y la fase orgánica se transfiere a un vial de HPLC, la cual se evapora hasta sequedad en condiciones de vacío y el extracto seco se

redisuelve en 80 μL de tolueno. Finalmente, se inyecta 1 μL del extracto final derivatizado y se analiza por GC-MS en modo SIM.

El esquema del procedimiento analítico descrito se describe en la **Figura IV.2**.

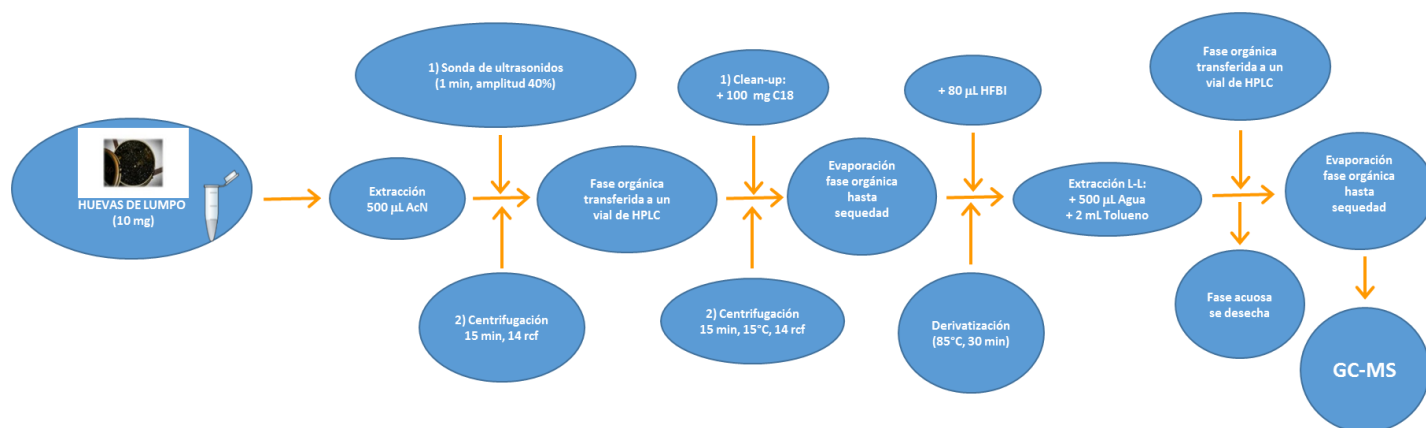


Figura IV.2. Esquema general del procedimiento analítico desarrollado para la determinación de fluoxetina, sertralina, citalopram, paroxetina y sus metabolitos (norfluoxetina, norsertralina y desmetilcitalopram) en huevos de lumpo mediante GC-MS.

IV.2.3. Larvas de pez cebra

Las muestras de larvas de pez cebra constituidas por 20 larvas cada una (peso aproximado de 10 mg) fueron fortificadas con 100 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ de cada analito a partir de una disolución conjunta con los cuatro compuestos parentales y tres metabolitos seleccionados, y 800 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ de estándar interno. En este caso se adicionaron 500 μL de acetonitrilo a todas las muestras y la etapa de extracción se favoreció con la ayuda de una sonda de ultrasonidos durante 1 minutos y 40% de amplitud. Los extractos se centrifugaron y purificaron con 0.1 g de C₁₈, que se mezcla con ayuda de un vórtex durante 20 segundos para favorecer la extracción. A continuación, el extracto se centrifugó durante 15 minutos, a 15°C y 14 rcf. El contenido orgánico se transfiere a un vial ámbar de HPLC de 4 mL con la finalidad de evaporar el extracto hasta sequedad en condiciones de vacío. Sobre el extracto seco, se añaden 100 μL de HFBI y la muestra se calienta a 85°C durante 30 minutos. Por último, los analitos derivatizados fueron reextraídos con 500 μL de agua y 2 mL de tolueno. La fase acuosa se desecha y la fase orgánica se transfiere a un vial de HPLC, la cual se evapora

hasta sequedad y el extracto seco se redisuelve en 80 μL de tolueno. Finalmente, se inyecta 1 μL del extracto final y se analiza por GC-MS en modo SIM.

El esquema del procedimiento analítico descrito se describe en la **Figura IV.3**.

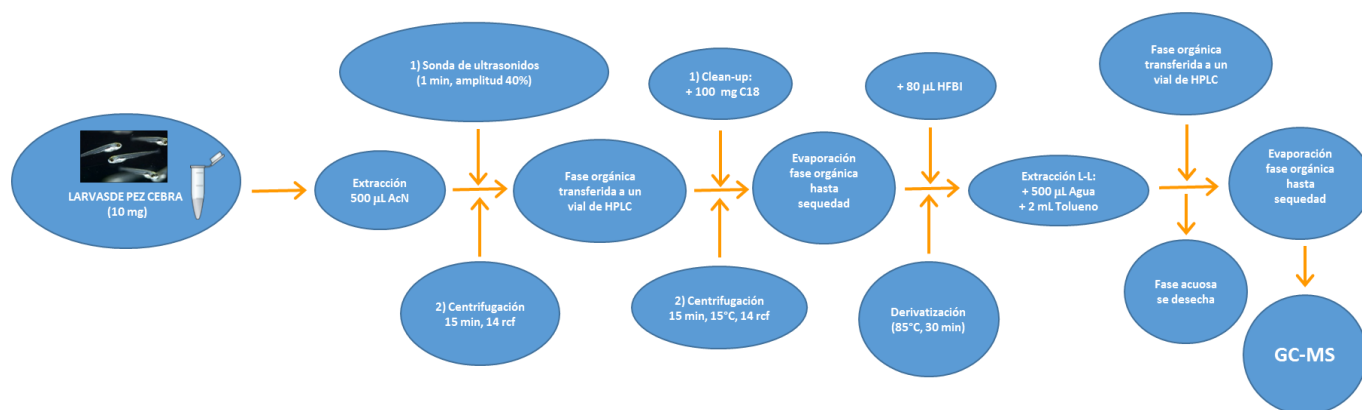


Figura IV.3. Esquema general del procedimiento analítico desarrollado para la determinación de fluoxetina, sertralina, citalopram, paroxetina y sus metabolitos (norfluoxetina, norsertralina y desmetilcitalopram) en larvas de pez cebra mediante GC-MS.

IV.2.4. Validación del método analítico desarrollado

Los métodos analíticos desarrollados para la determinación de los antidepresivos fueron evaluados en términos de linealidad, precisión, recuperación y límites de detección y cuantificación en blancos de muestras fortificadas con una mezcla de compuestos parentales y sus metabolitos. Las muestras analizadas (medio de exposición, huevos de lumpo y larvas de pez cebra) fueron tratadas según los métodos descritos en la sección IV.2. *Metodología analítica*. La evaluación de los diferentes parámetros de la validación del método analítico permite estimar la existencia de efecto matriz por comparación entre curvas de calibrado externo con calibrado en presencia de la matriz.

- Linealidad y efecto matriz:

Los analitos se extraen con los métodos descritos en las **Figuras IV.1., IV.2. y IV.3**. La linealidad se estudia a partir de un calibrado externo y otro en presencia de la matriz dopando muestras con concentraciones crecientes a partir de disoluciones preparadas

diariamente en el intervalo seleccionado. En el caso de los medios de cultivo, la calibración se llevó a cabo entre 10-200 ng·mL⁻¹ en medios de cultivo (usando 100 ng·mL⁻¹ de PAR-d6 como patrón interno), 80-1200 ng·g⁻¹ en huevos de pescado y 80-1600 ng·g⁻¹ en larvas de pez cebra (usando 800 ng·g⁻¹ de Par-d6 como patrón interno) para todos los analitos. Las muestras se almacenaron en condiciones de oscuridad y en nevera durante aproximadamente 24 horas, para permitir la interacción analito-matriz. Finalmente, los analitos se extrajeron y analizaron por GC-MS bajo las condiciones descritas en la sección IV.2. Metodología analítica. La presencia de picos interferentes se evaluó mediante el estudio de cada cromatograma a cada m/z seleccionada previamente para cada analito.

A partir de las rectas de calibrado, LODs y LOQs fueron obtenidos para cada analito testado, teniendo en cuenta señales de 3 o 10 la desviación estándar del punto inferior de la recta del calibrado en presencia de la matriz, respectivamente, con respecto a la pendiente de la recta de calibrado.

- Límites de detección y cuantificación:

El límite de detección y cuantificación fue calculado a partir de la relación señal ruido, empleando valores de 3 y 10, respectivamente. Se utilizan blancos dopados a la concentración más baja de cada uno de los analitos en los tres tipos de muestras evaluadas. Estos valores se corrigen acorde al efecto matriz para cada compuesto en cada muestra.

- Recuperación:

Los experimentos de recuperación (n = 6) se llevan a cabo usando muestras fortificadas a dos niveles de concentración a partir de una solución conjunta de todos los analitos a testar: 30 y 70 ng·mL⁻¹ en medios acuosos de cultivo, 240 y 560 ng·g⁻¹ en huevos de pescado y 240 y 560 ng·g⁻¹ en larvas de pez cebra. A todas las muestras analizadas se adicionó estándar interno (PAR-d₆) a una concentración de 100 ng·mL⁻¹ en medios acuosos de cultivo y 800 ng·g⁻¹ en huevos de pescado y larvas de pez cebra. La recuperación se evalúa utilizando un calibrado en presencia de la matriz para cada analito

analizado, teniendo en cuenta áreas de pico relativas al área del estándar interno, obteniendo la concentración encontrada interpolando la relación de área entre analito y estándar interno sobre la recta de calibrado representada y comparando con el valor de concentración teórica añadida.

- Precisión:

La precisión del método se determina a partir del análisis de seis extractos ($n = 5$) en el mismo día (precisión intra-day) y cinco muestras en tres días diferentes ($n = 15$) (precisión inter-day). Los extractos se obtienen a partir de muestras fortificadas con todos los analitos a la concentración de $30 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ y $70 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, 240 y $560 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ en huevos de lumpo y $240 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ y $560 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ en larvas de pez cebra. Los resultados se calculan como desviación estándar relativa y coeficiente de variación (RSD, %).

2.5. Factores de bioconcentración

El factor de bioconcentración (BCF) se estimó como la relación entre la concentración del compuesto en el organismo en el momento máximo de exposición (48 horas) y el valor de concentración media encontrada en el medio de exposición a 48 horas. Cuando no se alcanza el estado estacionario, los valores de BCF_k se pueden calcular a partir del modelo de primer orden de dos compartimentos (medio y organismo acuático)^{43, 55} que describe los procesos de captación y depuración como se recoge en el *Capítulo I. Introducción*.

IV.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.3.1. Optimización de las condiciones de separación

El análisis de antidepresivos a nivel de trazas por cromatografía de gases requiere procesos de derivatización previos debido a que son compuestos polares, térmicamente inestables y de baja volatilidad¹³⁹. En el caso de los SSRI, disponen de grupos amino por lo que el análisis por GC es insatisfactorio debido al mecanismo de adsorción y descomposición en la columna cromatográfica. Estas propiedades se mejoran con la derivatización, especialmente para disminuir su polaridad. Hay varios tipos de derivatización para estos compuestos: reacciones de acilación usando reactivos derivatizantes como ácido heptafluorobutírico (HFBA) o heptafluorobutirilimidazol (HFBI) o deshidratación de alcoholes terciarios para eliminar posibles puentes de hidrógeno, lo cual permite obtener mejores formas de pico de los compuestos derivatizados. En este tipo de reacciones, un átomo de hidrógeno lábil unido a un átomo de nitrógeno, se reemplaza por un grupo menos lábil y de menor polaridad¹⁶⁰⁻¹⁶¹.

En el presente trabajo, se seleccionó la derivatización mediante acilación como la más adecuada. La reacción derivatizante elegida fue la heptafluorobutirilación usando HFBA o HFBI como reactivos derivatizantes. Este tipo de reacción permite obtener compuestos derivados menos polares y más volátiles y con tiempos de retención menores debido a la estabilidad de los derivados que se forman. Además, como el agente derivatizante tiene siete átomos de flúor en su estructura, los compuestos que se forman tras la derivatización presentan mayor señal y, por tanto, mayor sensibilidad.

En este trabajo, se evaluaron dos reactivos derivatizantes: HFBI y HFBA. El uso de HFBI no permite derivatizar compuestos con aminas terciarias como el citalopram, pero este reactivo puede reaccionar con compuestos que presenten aminas primarias y secundarias en su estructura¹⁶². Para este propósito, se ensayaron soluciones de cada analito a la concentración de 1 y 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ preparadas en acetona con los dos reactivos derivatizantes. La reacción con HFBA se incubó a 50°C durante 30 minutos, acorde a las condiciones descritas en la literatura¹⁶¹. Sin embargo, la reacción de derivatización con

HFBI fue incubada a 85°C durante 30 minutos teniendo en cuenta estudios previos¹⁶². En este último caso, es necesario incluir una etapa de extracción líquido-líquido adicionando 500 µL de agua y 2 mL de tolueno sobre el extracto seco que se obtiene tras evaporar la cantidad adicionada de la solución inicial para eliminar el exceso de derivatizante. Los compuestos derivatizados se extraen a la fase orgánica y el exceso de reactivo derivatizante y otros subproductos de la reacción quedan retenidos en la fase acuosa. Una vez inyectados los extractos en el cromatógrafo de GC-MS e identificados (en modo SCAN) cada uno de los analitos mediante los tiempos de retención t_R y las relaciones m/z en los cromatogramas obtenidos mostraron áreas más bajas usando HFBA como agente derivatizante en comparación con las áreas obtenidas al derivatizar con HFBI. Por tanto, el HFBI fue seleccionado como derivatizante óptimo para los estudios posteriores.

Con objeto de disminuir el tiempo del análisis, la eficiencia del reactivo derivatizante HFBI fue evaluada eliminando la etapa de evaporación previa a la etapa de derivatización, adicionando el reactivo a cada solución de antidepressivos en proporción 50:50 o 70:30 (v/v). En ambos casos, las señales obtenidas fueron muy inferiores a las alcanzadas cuando el reactivo derivatizante se adiciona sobre el extracto seco. Como conclusión, la reacción de derivatización debe llevarse a cabo sobre el extracto seco después de la etapa de evaporación.

Otro parámetro evaluado fue la cantidad óptima de derivatizante. Para ello, se adicionaron distintos volúmenes de HFBI sobre el extracto previamente evaporado: 50 µL, 75 µL y 100 µL. Los resultados obtenidos para 50 µL y 75 µL fueron similares. Sin embargo, los mejores resultados, para todos los analitos, fueron obtenidos usando 100 µL de reactivo derivatizante en términos de valores de área, interferencias y sensibilidad.

IV.3.2. Identificación y cuantificación de SSRIs

Los compuestos parentales (fluoxetina, sertralina y paroxetina) así como sus metabolitos (norfluoxetina, norsertralina y desmetilcitalopram) fueron derivatizados usando 100 µL de HFBI, a excepción de citalopram, el cual puede ser analizado sin derivatización previa.

Este compuesto no presenta grupos amino derivatizables y tiene un bajo punto de ebullición.

Una vez seleccionado el reactivo derivatizante óptimo y el volumen adecuado del mismo, fueron evaluadas varias rampas de temperatura con el objetivo de obtener una separación y perfil cromatográfico adecuado. El programa de temperatura seleccionado se describe en **Tabla IV.3**.

Tabla IV.3. Gradiente de temperatura optimizado para el análisis de SSRIs.

Rampa	Temperatura (°C)	Tiempo de espera (min)
-	90°C	1 min
15°C/min	180°C	2 min
15°C/min	300°C	1.5 min

Para la identificación de los analitos de interés en muestras acuosas, huevos de lumpo y larvas de pez cebra, se compararon los tiempos de retención de cada analito en las diferentes muestras con respecto a soluciones estándar. Los siete analitos fueron separados en aproximadamente 18.5 min obteniendo un cromatograma libre de interferencias (**Figura IV.4.**) a los tiempos de retención de los analitos testados en modo SIM.

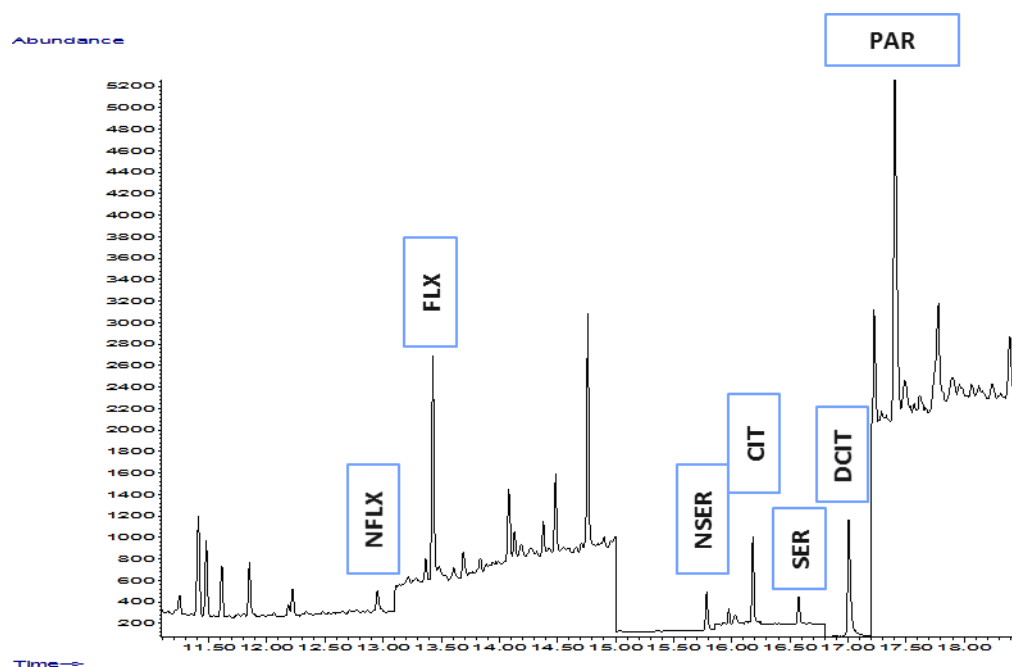


Figura IV.4. Cromatograma obtenido del análisis de una solución estándar de SSRIs a una concentración de 20 ng·mL⁻¹ de cada analito.

Los tiempos de retención así como las m/z seleccionadas para cada analito se muestran en la **Tabla IV.4**. Estos valores se obtuvieron del análisis de una disolución estándar de cada analito a una concentración de 1 y 5 µg·mL⁻¹ en modo SCAN, confirmando cada tiempo de retención y m/z de cada compuesto de forma individual en modo SIM. Los valores m/z obtenidos, están en concordancia con lo encontrado en la literatura²⁶.

Tabla IV.4. Valores de t_R y m/z obtenidos para cada SSRI parental y sus metabolitos mediante GC-MS.

Substancia	t _R (min)	Detected m/z
Fluoxetina	13.433	117, 169, 240, 344
Sertralina	16.575	274, 276, 501
Paroxetina	17.426	109, 135, 525
Citalopram	15.975	58, 238, 324
Norfluoxetina	12.938	117, 330
Norsertalina	15.776	274, 276
Desmetilcitalopram	17.000	238

La cuantificación de cada analito se realizó empleando un calibrado de patrón interno. Para ello, se evaluaron varios estándares y se seleccionaron varios compuestos de estructura similar a los fármacos estudiados entre los que se encuentran efedrina,

linuron, metanefrina, ritodrina, terbutalina y proterenol. Además, otros compuestos disponibles en el laboratorio fueron evaluados, como triclosán, diclofenaco, ibuprofeno, naproxeno y ácido clofíbrico, analizados bajo las condiciones de derivatización optimizadas en la *sección IV.3.1*. Los resultados sólo fueron satisfactorios para efedrina y ritrodrina en modo SCAN y modo SIM, pero ambos compuestos fueron descartados por presentar una precisión pobre con valores de área muy dispares en las soluciones evaluadas. Por este motivo, se estudiaron compuestos deuterados diferentes y similares a los analitos de interés. En este caso, se seleccionaron sertralina- d_3 , paroxetina- d_6 y fluoxetina - d_6 para el estudio por su similitud en su estructura y propiedades físico-químicas a los fármacos parentales y sus metabolitos. Para ello, se prepararon soluciones de cada estándar deuterado a la concentración de 1 y 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de cada compuesto en metanol. Los extractos fueron evaporados hasta sequedad y se adicionaron 100 μL de HFBI para derivatizar los analitos a 85°C durante 30 minutos. El extracto final se analizó por GC-MS y se obtuvieron los espectros de masas a partir del análisis por GC-MS en modo SCAN, obteniendo así las relaciones de m/z necesarias para poder identificar y cuantificar cada analito. En el caso del estándar sertralina- d_6 y fluoxetina- d_6 , coinciden con las m/z de los compuestos de los que derivan, en este caso, sertralina y fluoxetina, respectivamente, por lo que no se puede discernir el área que proviene del compuesto deuterado del parental. Además, las señales de área obtenidas en cada caso no permitían obtener bajos LOD ni LOQ en cada analito y las señales obtenidas no fueron reproducibles en las diferentes inyecciones llevadas a cabo. Sin embargo, para paroxetina- d_6 , fue posible discernir entre paroxetina y paroxetine- d_6 y establecer m/z diferentes que permitan extraer el cromatograma en modo SIM a cada m/z y obtener un pico cromatográfico con una señal suficiente para poder ser cuantificada a pesar de presentar el mismo tiempo de retención. Los valores de área obtenidos fueron satisfactorios utilizando paroxetina- d_6 por lo que fue elegido como estándar interno para todos los estudios siguientes. Por tanto, de los tres compuestos deuterados, se seleccionó Paroxetine- d_6 como estándar interno óptimo debido a que ofrece elevada señal en términos de área y, por tanto, buena sensibilidad, tiempos de retención adecuados acorde a los obtenidos para los compuestos parentales y sus metabolitos, señales reproducibles y respuesta lineal a los antidepresivos SSRI en todo el rango de concentración evaluado.

A partir de estos datos, desarrollamos un método SIM utilizando los t_R y las masas de cada analito, los cuales se recogen en la **Tabla IV.4.** para cuantificar los analitos testados, usando la suma de área de los iones seleccionados para cada compuesto²⁷⁻²⁸. La **Figura IV.5.** muestra un cromatograma de una solución que contiene $20 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ de todos los analitos estudiados derivatizados y $50 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ de Par- d_6 como estándar interno. Como puede observarse, todos los analitos analizados se separan en un tiempo de cromatograma inferior a 18.5 minutos. En el caso del estándar interno, las m/z seleccionadas fueron: 111, 137, 531, obteniéndose a un tiempo de retención coincidente con paroxetina. Para obtener el área de cada compuesto, es necesario extraer el cromatograma al valor de m/z de interés. La contribución del estándar interno será la suma de las tres áreas obtenidas extraídas a cada m/z .

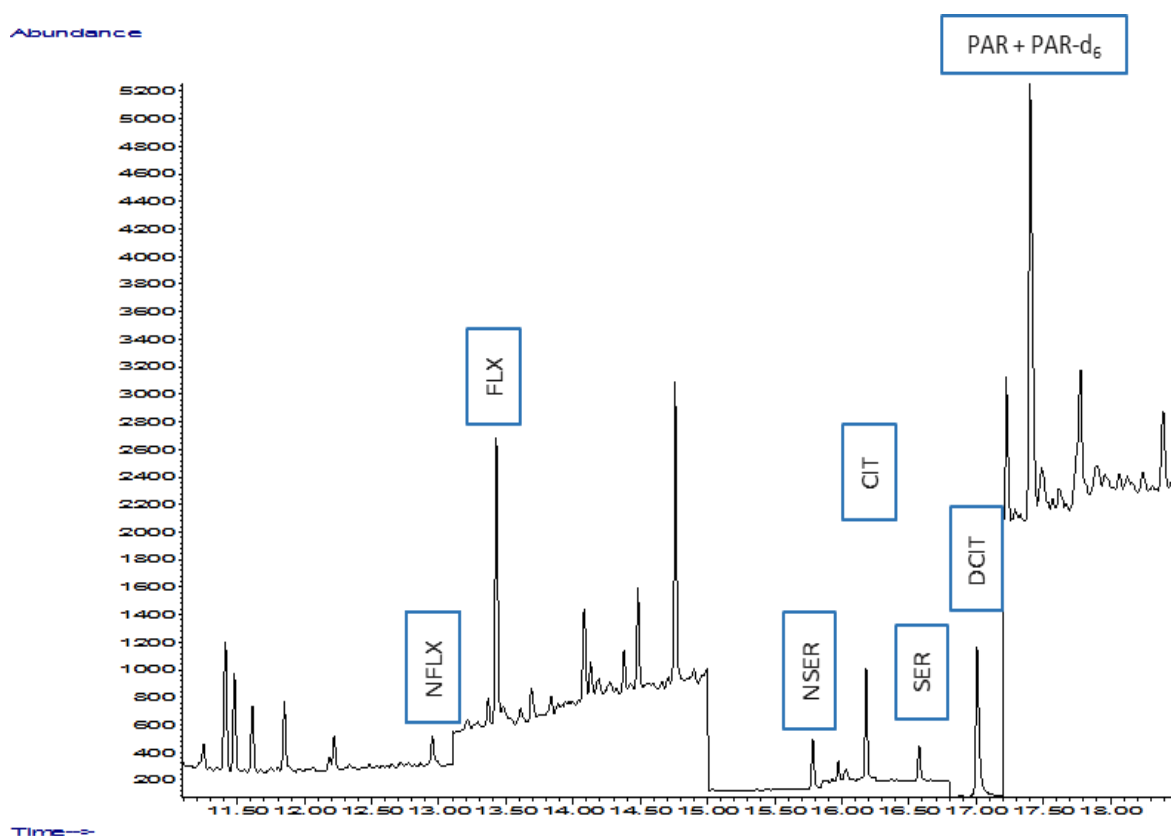


Figura IV.5. Cromatograma obtenido por GC-MS de una solución estándar de los cuatro compuestos parentales y tres metabolitos a $20 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ y estándar interno a $50 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$.

IV.3.3. Optimización de la etapa de extracción y clean-up

La preparación de las distintas muestras, medios de cultivo, huevos de lumpo y larvas de pez cebra, consta fundamentalmente de dos etapas:

- a) Extracción de los analitos de la matriz de cada muestra con un disolvente orgánico.
- b) En huevos de lumpo y larvas de pez cebra, es necesario llevar a cabo una etapa de clean-up de los extractos en las muestras ya tratadas con el disolvente orgánico, la cual permite reducir la presencia de interferencias y el efecto matriz en la cuantificación de los mismos.

La optimización de los distintos procedimientos se realizó basándose en las recuperaciones obtenidas de la señal obtenida para los compuestos en las muestras tratadas con el método desarrollado respecto a la señal obtenida de los patrones de cada analito. Las recuperaciones se calcularon en porcentaje total estableciendo la relación de área de pico del analito con respecto al área de pico del estándar interno.

IV.3.3.1. Medios de cultivo

En el caso de los medios de cultivo, la extracción de los siete fármacos se llevó a cabo mediante una extracción líquido-líquido (LLE). Se evaluaron como disolventes tolueno y acetato de etilo (1000 μL), los cuales se utilizaron para extraer 500 μL de medio de cultivo fortificado con 30 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ de cada fármaco y 100 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ de paroxetina- d_6 . Los resultados obtenidos para cada solvente se incluyen en la **Tabla IV.5.**, en donde se muestra que las recuperaciones obtenidas usando tolueno como solvente de extracción son superiores en comparación con los resultados obtenidos con acetato de etilo. Además, los extractos de muestra analizados obtenidos tras la extracción con este solvente orgánico permitieron obtener cromatogramas más limpios. Este hecho junto con los % de recuperación más elevados en comparación con los obtenidos usando acetato de etilo, hace que sea seleccionado como solvente de extracción óptimo en los medios de cultivo testados.

Tabla IV.5. Recuperaciones (%) y CV (%) obtenidas para cada analito testado en medios de cultivo (500 μL) fortificados con 30 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ de cada analito y 100 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ de estándar interno usando diferentes solventes de extracción (n = 3).

%R	Tolueno	AcOEt
Fluoxetina	91 \pm 9	100 \pm 3
Norfluoxetina	82 \pm 13	43 \pm 7
Sertralina	95 \pm 7	59 \pm 2
Norsertralina	114 \pm 10	69 \pm 2
Citalopram	87 \pm 5	27 \pm 5
Desmetilcitalopram	89 \pm 6	67 \pm 5
Paroxetina	70 \pm 2	81 \pm 1

IV.3.3.2. Huevas de lumpo

Para el tratamiento de huevas de lumpo, una extracción en fase sólida dispersiva se seleccionó como método para extraer y limpiar los extractos. Para favorecer la extracción, la sonda de ultrasonidos se ha empleado (tiempo de sonicación: 60s, amplitud: 40%), en donde las condiciones se han establecido en base a trabajos previos del grupo de investigación^{76,143}. Se utilizaron blancos de huevas de lumpo comerciales (10 mg) y huevas de lumpo fortificadas con 240 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ de fluoxetina, sertralina, paroxetina y citalopram y sus metabolitos, norfluoxetina, norsertralina y desmetilcitalopram en la misma concentración que sus compuestos parentales. En todas las muestras analizadas, se adicionaron 800 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ de paroxetina- d_6 como estándar interno. Tanto los blancos sin fortificar como las muestras fortificadas fueron tratadas con diferentes disolventes orgánicos: metanol, acetonitrilo y acetato de etilo, elegidos para este estudio acorde a la literatura existente^{141,145,163}. Todos estos experimentos se realizaron con el absorbente C_{18} como etapa de limpieza que posteriormente se optimizará. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla IV.6.**, y como se puede observar las recuperaciones obtenidas con metanol o acetato de etilo como solvente de extracción fueron más bajas en comparación a los valores obtenidos con acetonitrilo, que da lugar a recuperaciones comprendidas entre 89-115% para todos los analitos estudiados. Todos los resultados se calcularon considerando la relación entre el área de pico de cada analito con respecto al área de pico del estándar interno. Además, los cromatogramas obtenidos con este último

disolvente fueron muy limpios y no mostraron interferencias a los tiempos de retención de los distintos SSRI.

Tabla IV.6. Recuperaciones (%) y CV (%) obtenidas para cada analito testado en huevos de lumpo (10 mg) fortificados con 240 ng·g⁻¹ de cada analito y 800 ng·g⁻¹ de estándar interno usando diferentes disolventes de extracción (n = 3).

	AcN	MeOH	AcOEt
Fluoxetina	108 ± 1	87 ± 3	100 ± 3
Norfluoxetina	105 ± 12	104 ± 5	43 ± 7
Sertralina	98 ± 8	113 ± 4	59 ± 2
Norsertalina	115 ± 10	48 ± 4	69 ± 2
Citalopram	89 ± 9	108 ± 5	27 ± 5
Desmetilcitalopram	98 ± 4	77 ± 3	67 ± 5
Paroxetina	109 ± 6	87 ± 1	81 ± 1

Para eliminar el efecto matriz y el contenido lipídico coextraído, es necesario optimizar una etapa de limpieza o *clean-up* con un sorbente adecuado. Para este propósito, un se llevó a cabo un método de *d*-SPE ensayando con 0.1 g de varios sorbentes comerciales: C₁₈, PSA, Z-sep (C₁₈ modificado con Zirconio se recomienda para muestras con contenido lipídico, por debajo de un 15%), Florisil y carbón grafitado. El absorbente correspondiente se adicionó a los extractos de las muestras de huevos de lumpo fortificadas con 240 ng·g⁻¹ de cada analito y 800 ng·g⁻¹ de estándar interno. Las muestras se analizaron mediante CG-MS con el método optimizado y se evaluó el sorbente óptimo en términos de ausencia de interferencias y recuperaciones. Aunque con el PSA, el Z-sep y el carbón presentan un cromatograma limpio, las recuperaciones obtenidas para la mayoría de los analitos fueron muy bajas (ver **Tabla IV.7.**). Por el contrario, las recuperaciones encontradas cuando se utiliza C₁₈ como sorbente fueron en todos los casos superiores al 90%. En conclusión, se eligió el sorbente C₁₈ como óptimo para a llevar a cabo la etapa de limpieza.

Tabla IV.7. Recuperaciones (%) obtenidas para cada analito testado en huevos de lumpo (10 mg) fortificados con $240 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ de cada analito y $800 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ de estándar interno usando diferentes sorbentes en la etapa de clean-up ($n = 3$).

	C ₁₈	Carbon	PSA	Zsep
Fluoxetina	93 ± 11	79 ± 19	65 ± 2	24 ± 4
Norfluoxetina	93 ± 9	66 ± 6	81 ± 4	93 ± 29
Sertralina	99 ± 4	32 ± 8	66 ± 11	11 ± 3
Norsertralina	106 ± 7	103 ± 15	75 ± 9	73 ± 2
Citalopram	93 ± 8	40 ± 2	70 ± 22	38 ± 12
Desmetilcitalopram	108 ± 14	87 ± 11	67 ± 4	22 ± 4
Paroxetina	90 ± 1	21 ± 12	63 ± 3	29 ± 2

IV.3.3.3. Larvas de pez cebra

El método propuesto en huevos de lumpo fue aplicado a la determinación de los cuatro fármacos antidepresivos y tres metabolitos en larvas de pez cebra. Para ello, se preparan muestras control, (en ausencia de contaminantes, constituidas por 15-20 larvas con un peso húmedo de 10 mg) y muestras fortificadas a un nivel de concentración de $240 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ de cada analito y $800 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ de paroxetina- d_6 . Los resultados mostraron la efectividad del método propuesto y no se observaron picos interferentes en los cromatogramas a los tiempos de retención de los cuatro compuestos testados. En la **Tabla IV.8.** se muestran los valores de recuperación obtenidos para los SSRIs y sus metabolitos en larvas de pez cebra aplicando el método propuesto.

Tabla IV.8. Recuperaciones (%) obtenidas para cada analito testado en larvas de pez cebra (10 mg) fortificadas con $240 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ de cada analito y $800 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ de estándar interno ($n = 3$).

COMPUESTO	%R
Fluoxetina	91 ± 9
Norfluoxetina	93 ± 5
Sertralina	101 ± 6
Norsertralina	103 ± 7
Citalopram	96 ± 9
Desmetilcitalopram	102 ± 3
Paroxetina	99 ± 4

IV.3.4. Validación de la metodología analítica propuesta

La validación de los métodos analíticos propuestos se realizó examinando los siguientes parámetros de calidad: linealidad, efecto matriz, límites de detección y de cuantificación, exactitud a través de la recuperación y precisión en diferentes muestras analizadas: medio de cultivo, huevos de lumpo comercial y larvas de pez cebra.

- Linealidad y efecto matriz:

La linealidad fue evaluada a partir de un calibrado empleando patrón interno en el intervalo comprendido entre 80-1200 ng·g⁻¹ de cada analito en huevos de lumpo, 80-1600 ng·g⁻¹ en larvas de pez cebra fortificada (usando 800 ng·g⁻¹ de Par-d₆ como estándar interno en ambos tipos de muestras) y 10-200 ng·mL⁻¹ en medios de cultivo (usando 100 ng·mL⁻¹ de paroxetina-d₆). Los coeficientes de correlación fueron obtenidos para todos los analitos estudiados, siendo en todos los casos >0,995- El posible efecto matriz se evaluó comparando las pendientes del calibrado externo con un calibrado en presencia de las diferentes matrices: medios de cultivo, huevos de lumpo y larvas de pez cebra. Se observó efecto matriz en huevos de lumpo para todos los analitos testados (**Tabla IV.9.**), el cual fue minimizado por la adición de C₁₈ como sorbente en la etapa de clean-up. Sin embargo, para la evaluación de las recuperaciones, se prepararon calibrados en presencia de la matriz y la cuantificación de los analitos se obtuvo por interpolación de la relación de señales entre el analito de interés y el estándar interno en cada uno de ellos. Los analitos fueron extraídos y analizados por GC-MS bajo las condiciones descritas en la sección IV.2.

- Límites de detección y cuantificación:

Se obtuvieron LODs y LOQs para cada analito a partir de blancos de muestras fortificadas al nivel más bajo de cada analito en la correspondiente muestra del calibrado sobre matriz: 10 ng·mL⁻¹ en muestras acuosas y 80 ng·g⁻¹ en huevos de lumpo y larvas de pez cebra. Los resultados de LODs fueron entre 0.3-2.3 ng·mL⁻¹, 6.4-62.4 ng·g⁻¹ y 6.6-26.4 ng·g⁻¹ en medios de cultivo, huevos de lumpo y larvas de pez cebra, respectivamente. Los

valores de LOQ estuvieron comprendidos entre 1.0-7.6 ng·mL⁻¹, 22.4-218.4 ng·g⁻¹ y 21.8-87.1 ng·g⁻¹ en medios de cultivo, huevos de lumpo y larvas de pez cebra, respectivamente.

- Recuperación y precisión:

Los valores de recuperación obtenidos se muestran en la **Tabla IV.9.** así como los valores de precisión obtenidos para los experimentos realizados en el mismo día y en días diferentes. Los valores de recuperación se obtienen a dos niveles de concentración: 30 ng·mL⁻¹ y 70 ng·mL⁻¹ en medios de cultivo y 240 y 560 ng·g⁻¹ en huevos de lumpo y larvas de pez cebra (n = 5 para cada tipo de muestra estudiada). Como puede observarse en los resultados mostrados, el método propuesto permite obtener valores de recuperación próximos al 100% con valores de RSD (%) inferiores al 10% en todos los analitos y para los tres tipos de muestras evaluadas.

Tabla IV.9. Precisión (mismo día y días diferentes), %RSD, obtenidos para cada analito testado en medios de cultivo, huevos de lumpo (10 mg) y larvas de pez cebra fortificadas a dos niveles de concentración con los siete compuestos y Par-d₆ como estándar interno.

Medios de cultivo	Precisión (mismo día)					
	30 ng·mL ⁻¹			70 ng·mL ⁻¹		
	Concentración obtenida (ng·mL ⁻¹)	RSD, % (n=5)	%R	Concentración obtenida (ng·mL ⁻¹)	RSD, % (n=5)	%R
NFLX	29.7 ± 0.2	4%	99 ± 1	72.8 ± 5.5	1%	104 ± 8
FLX	30.4 ± 2.0	2%	101 ± 7	74.2 ± 0.6	2%	106 ± 1
NSER	32.0 ± 3.0	6%	107 ± 10	74.3 ± 4.1	5%	106 ± 6
SER	29.0 ± 0.2	5%	97 ± 1	66.6 ± 2.7	4%	95 ± 4
DCIT	29.5 ± 1.4	1%	98 ± 4	75.5 ± 4.1	2%	108 ± 6
CIT	30.2 ± 1.1	3%	101 ± 3	68.7 ± 2.0	1%	98 ± 3
PAR	31.6 ± 2.8	2%	105 ± 9	76.4 ± 2.1	1%	109 ± 3
Huevas de lumpo	Precisión (mismo día)					
	240 ng·g ⁻¹			560 ng·g ⁻¹		
	Concentración obtenida (ng·mL ⁻¹)	RSD, % (n=5)	%R	Concentración obtenida (ng·mL ⁻¹)	RSD, % (n=5)	%R
NFLX	244.2 ± 9.6	3%	102 ± 4	554.3 ± 5.5	1%	99 ± 1
FLX	238.3 ± 4.0	7%	99 ± 2	565.6 ± 39.2	2%	101 ± 7
NSER	234.8 ± 8.9	1%	98 ± 4	599.1 ± 56.0	4%	107 ± 10
SER	229.7 ± 2.3	2%	96 ± 1	543.1 ± 5.7	3%	97 ± 1
DCIT	247.6 ± 6.9	4%	103 ± 3	548.8 ± 22.3	1%	98 ± 4
CIT	249.9 ± 6.2	2%	104 ± 3	565.4 ± 16.7	3%	101 ± 3
PAR	242.0 ± 5.1	2%	101 ± 2	587.9 ± 50.5	4%	105 ± 9
Larvas de pez cebra	Precisión (mismo día)					
	240 ng·g ⁻¹			560 ng·g ⁻¹		
	Concentración obtenida (ng·mL ⁻¹)	RSD, % (n=5)	%R	Concentración obtenida (ng·mL ⁻¹)	RSD, % (n=5)	%R

NFLX	237.5 ± 2.3	1%	99 ± 1	571.0 ± 22.2	2%	102 ± 4
FLX	242.5 ± 7.2	1%	101 ± 3	565.4 ± 28.2	3%	101 ± 5
NSER	235.0 ± 9.5	6%	98 ± 4	543.2 ± 33.5	6%	97 ± 6
SER	247.6 ± 6.9	4%	103 ± 2	537.5 ± 11.1	2%	96 ± 2
DCIT	244.9 ± 7.1	2%	102 ± 3	576.8 ± 5.6	3%	103 ± 1
CIT	232.6 ± 4.7	2%	97 ± 2	548.9 ± 16.9	1%	98 ± 3
PAR	242.3 ± 14.3	3%	101 ± 6	599.1 ± 5.5	4%	107 ± 1
Medios de cultivo	Precisión (días diferentes)					
	30 ng·mL ⁻¹			70 ng·mL ⁻¹		
	Concentración obtenida (ng·mL ⁻¹)	RSD, % (n=5)	%R	Concentración obtenida (ng·mL ⁻¹)	RSD,% (n=5)	%R
	NFLX	33.1 ± 1.8	3%	110 ± 6	72.1 ± 2.2	2%
FLX	32.2 ± 1.6	1%	107 ± 5	72.7 ± 5.6	2%	104 ± 8
NSER	28.8 ± 0.8	4%	96 ± 3	66.4 ± 2.2	3%	95 ± 3
SER	29.2 ± 1.2	4%	97 ± 4	69.3 ± 3.3	4%	99 ± 5
DCIT	33.3 ± 1.5	6%	111 ± 5	74.7 ± 5.7	2%	107 ± 8
CIT	32.0 ± 0.3	3%	107 ± 1	70.5 ± 3.4	5%	101 ± 5
PAR	33.0 ± 1.7	2%	110 ± 6	73.6 ± 2.8	3%	105 ± 4
Huevas de lumpo	Precisión (días diferentes)					
	240 ng·g ⁻¹			560 ng·g ⁻¹		
	Concentración obtenida (ng·mL ⁻¹)	RSD, % (n=5)	%R	Concentración obtenida (ng·mL ⁻¹)	RSD,% (n=5)	%R
	NFLX	243.6 ± 9.6	3%	102 ± 4	571.0 ± 5.5	4%
FLX	249.9 ± 6.4	2%	104 ± 3	554.5 ± 22.3	3%	99 ± 4
NSER	232.6 ± 14.1	3%	97 ± 6	537.7 ± 16.9	4%	96 ± 3
SER	237.0 ± 6.9	6%	99 ± 3	565.5 ± 22.4	3%	101 ± 4
DCIT	238.9 ± 2.6	7%	99 ± 1	548.7 ± 22.3	5%	98 ± 4
CIT	241.7 ± 12.3	2%	101 ± 5	560.1 ± 11.3	3%	100 ± 2
PAR	252.5 ± 6.6	1%	105 ± 3	543.2 ± 33.5	1%	97 ± 6
Larvas de pez cebra	Precisión (días diferentes)					
	240 ng·g ⁻¹			560 ng·g ⁻¹		
	Concentración obtenida (ng·mL ⁻¹)	RSD, % (n=5)	%R	Concentración obtenida (ng·mL ⁻¹)	RSD,% (n=5)	%R
	NFLX	237.7 ± 4.7	3%	99 ± 2	537.5 ± 22.4	1%
FLX	244.8 ± 7.1	2%	102 ± 3	554.4 ± 11.1	3%	99 ± 2
NSER	247.0 ± 11.9	7%	103 ± 5	565.4 ± 22.3	4%	101 ± 4
SER	242.5 ± 2.3	4%	101 ± 1	571.4 ± 5.6	5%	102 ± 1
DCIT	235.3 ± 12.1	6%	98 ± 5	548.8 ± 11.1	3%	98 ± 2
CIT	239.9 ± 7.2	4%	100 ± 3	565.4 ± 16.9	5%	101 ± 3
PAR	232.7 ± 9.7	3%	97 ± 4	571.2 ± 11.2	1%	102 ± 2

IV.3.5. Ensayos de bioacumulación

El establecimiento de los BCFs para cada uno de los SSRI se realizó llevando a cabo los ensayos de bioacumulación descritos en el apartado IV.1.3. *Muestras y experimentos de bioacumulación*. Se analizaron tanto los medios de cultivo a diferentes tiempos de exposición para controlar la estabilidad de los mismos como las larvas de pez cebra expuestas a distintos tiempos de absorción (0, 6, 24, 45 y 48h) a los distintos fármacos: fluoxetina, sertralina, citalopram y paroxetina y tres de sus metabolitos, norfluoxetina,

norsertralina y desmetilcitalopram. Todas las muestras se trataron según los procedimientos descritos en la sección IV.2. *Metodología analítica*.

Como se ha mencionado, los ensayos se realizaron a dos concentraciones para los compuestos parentales (fluoxetina, sertralina, paroxetina y citalopram) a $80 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ y $300 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ mientras que el ensayo de los metabolitos se llevó a cabo a $80 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ y $300 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ para desmetilcitalopram y $50 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ y $100 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ para norfluoxetina y norsertralina.

Los resultados obtenidos para los medios de exposición a los distintos fármacos se encuentran recogidos en la **Tabla IV.10**. A modo de ejemplo, la **Figura IV.6.**, muestra las variaciones en la concentración de paroxetina en el ensayo de menor concentración nominal ($80 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) y en la concentración de desmetilcitalopram para el ensayo de mayor concentración nominal ($300 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$). La variación en la concentración a lo largo de la etapa de absorción es muy baja y posiblemente se debe a las bajas concentraciones utilizadas para establecer la concentración del ensayo en base al LC_{50} de cada analito, acorde a los requerimientos de la OCDE 305^{53,62,80-82}. Es importante destacar que la mayoría de los estudios de bioacumulación o bioconcentración publicados emplearon la concentración nominal sin llegar a monitorizar la concentración durante todo el experimento para el cálculo de los parámetros de toxicocinética, lo que contradice las normas de la OCDE 305.

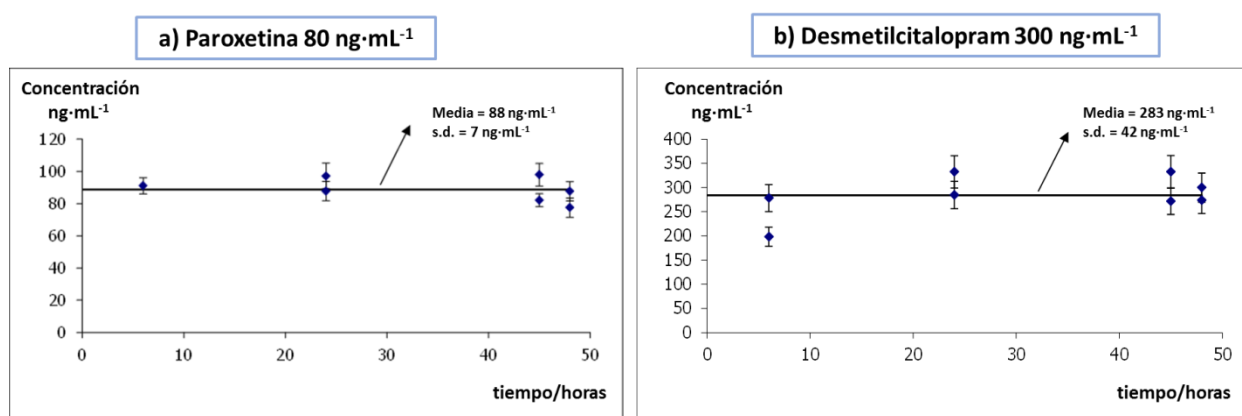


Figura IV.6. Variación de la concentración media encontrada en los medios de cultivo durante los experimentos de bioconcentración a) Paroxetina a $80 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ and b) desmetilcitalopram a $300 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$.

La variación de la concentración encontrada en las larvas para los diferentes SSRIs y sus metabolitos a las diferentes concentraciones en el ensayo de bioacumulación durante la etapa de absorción se muestra en las **Figura IV.7. a Figura IV.13**. Los resultados muestran un aumento en todas las concentraciones de los fármacos seleccionados durante toda la fase de absorción pero presentan perfiles diferentes. En el caso de desmetilcitalopram y sertralina, la etapa estacionaria se alcanza muy temprano, en un tiempo inferior a 40 horas, aunque el incremento de la concentración no es muy relevante. Para el resto de fármacos parentales así como sus metabolitos, el aumento de concentración es más suave y la saturación (estado estacionario) no se observa de forma tan evidente. De hecho, parece que el estado estacionario no se alcanza en ningún caso.

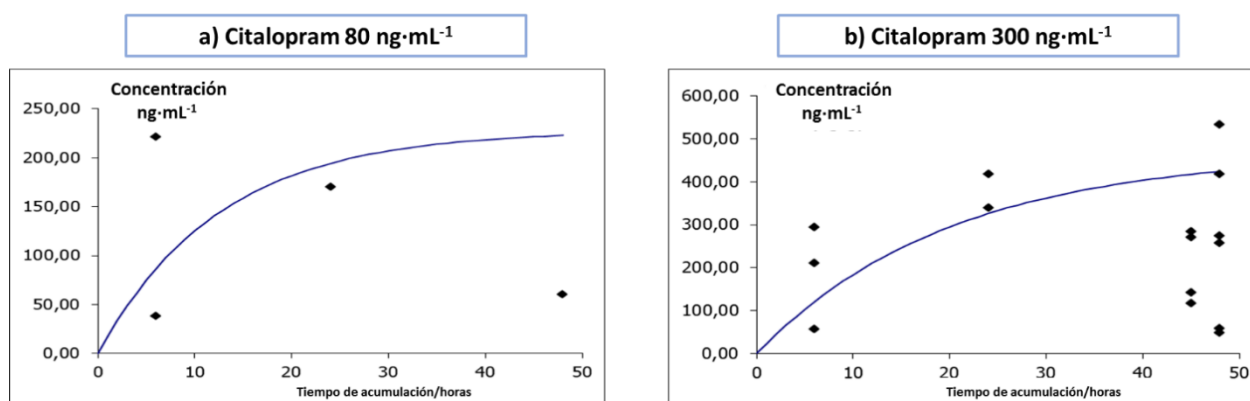


Figura IV.7. Variación de la concentración media encontrada en los ensayos de bioacumulación en larvas de pez cebra expuestas a la concentración de: a) Citalopram a 80 ng·mL⁻¹ and b) Citalopram a 300 ng·mL⁻¹.

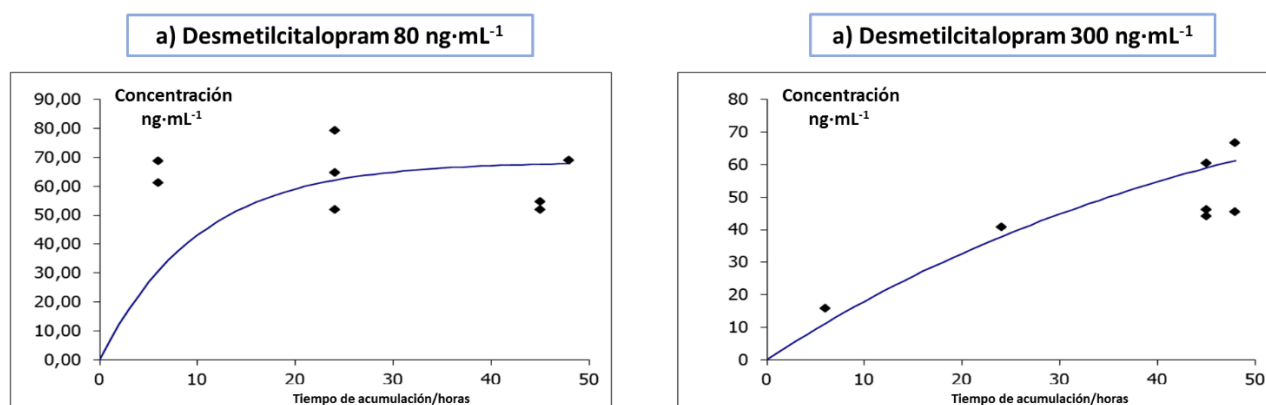


Figura IV.8. Variación de la concentración media encontrada en los ensayos de bioacumulación en larvas de pez cebra expuestas a la concentración de: a) Desmetilcitalopram 80 ng·mL⁻¹ and b) Desmetilcitalopram a 300 ng·mL⁻¹.

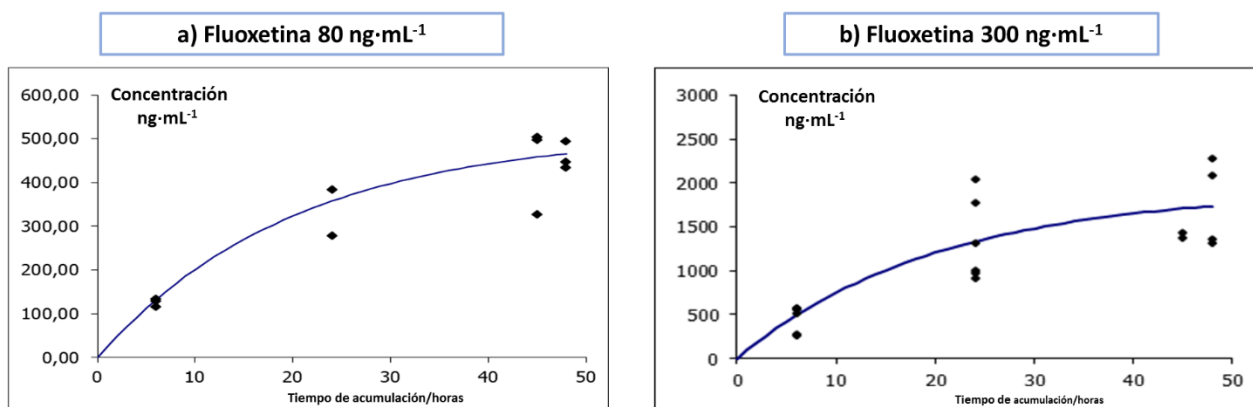


Figura IV.9. Variación de la concentración media encontrada en los ensayos de bioacumulación en larvas de pez cebra expuestas a la concentración de: a) Fluoxetina a 80 ng·mL⁻¹ and b) Fluoxetina a 300 ng·mL⁻¹.

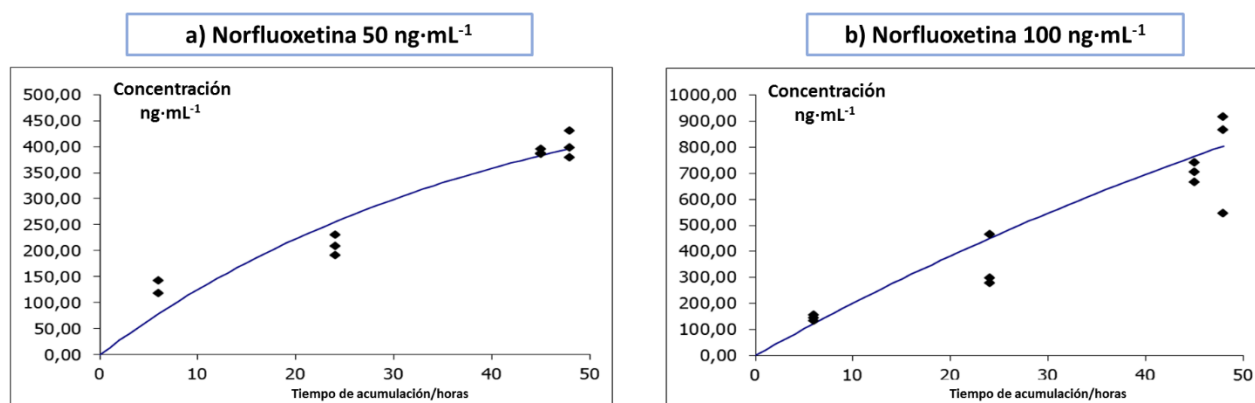


Figura IV.10. Variación de la concentración media encontrada en los ensayos de bioacumulación en larvas de pez cebra expuestas a la concentración de: a) Norfluoxetina 50 ng·mL⁻¹ y b) Norfluoxetina a 100 ng·mL⁻¹.

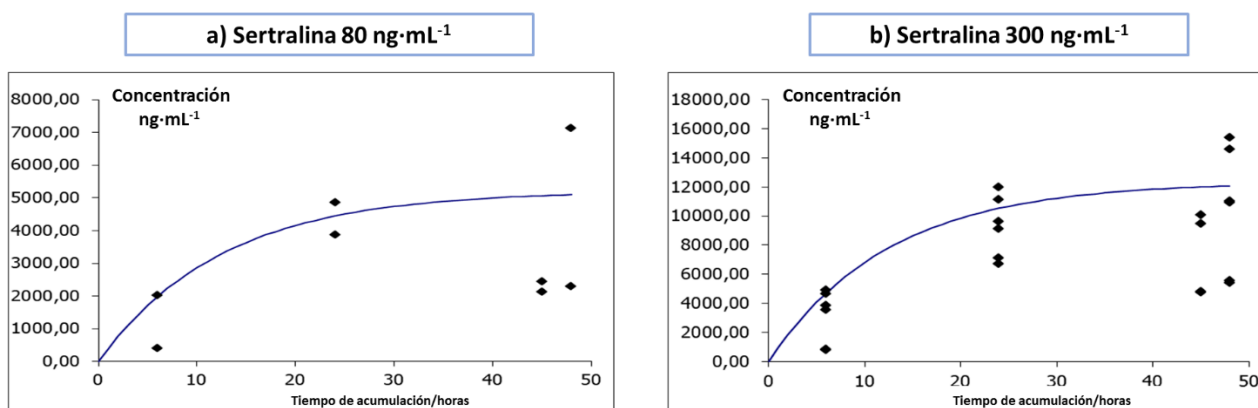


Figura IV.11. Variación de la concentración media encontrada en los ensayos de bioacumulación en larvas de pez cebra expuestas a la concentración de: a) Sertralina 80 ng·mL⁻¹ y b) Sertralina a 300 ng·mL⁻¹.

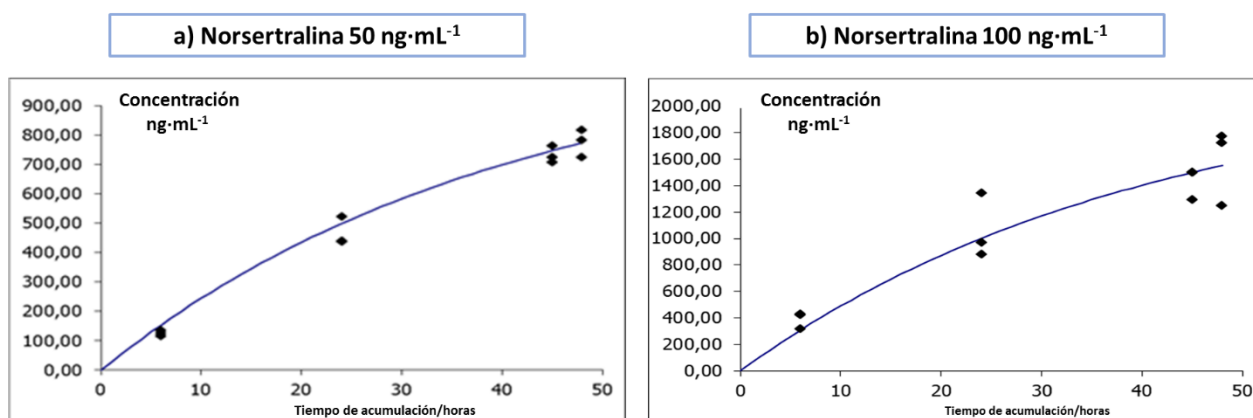


Figura IV.12. Variación de la concentración media encontrada en los ensayos de bioacumulación en larvas de pez cebra expuestas a la concentración de: a) Norsertralina 50 ng·mL⁻¹ y b) Norsertralina a 100 ng·mL⁻¹.

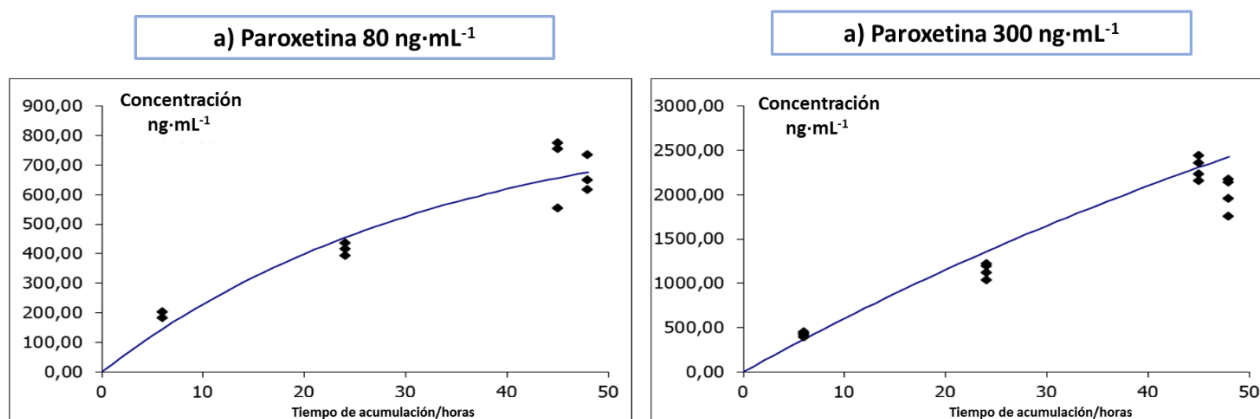


Figura IV.13. Variación de la concentración media encontrada en los ensayos de bioacumulación en larvas de pez cebra expuestas a la concentración de: a) Paroxetina 80 ng·mL⁻¹ y b) Paroxetina a 300 ng·mL⁻¹.

En base a los resultados, y asumido que el estado estacionario no se alcanza en ningún caso salvo para sertralina, para estimar el valor de los factores de bioconcentración, los datos experimentales se ajustaron al modelo cinético de primer orden mencionado en la introducción, el cual permite obtener las constantes k_1 y k_2 así como el valor de BCF_k . El valor de BCF_{48h} lo obtenemos dividiendo los valores de las concentraciones en las larvas para cada compuesto a las 48 horas entre las concentraciones en los medios correspondientes.

Tabla IV.10. Variación de la concentración media encontrada para cada SSRI en los medios de exposición y factores de bioacumulación calculados acorde a los dos ajustes.

	C_w (ng·mL ⁻¹)	BCF _k	BCF _{48h}
Citalopram	60	3,75	3,66
	291	1,6	1,45
Desmethylocitalopram	97	0,7	0,69
	283	0,35	0,21
Fluoxetina	64	8,1	7,27
	238	8	7,3
Norfluoxetina	47	12	8,4
	105	20	7,6
Sertralina	104	50	48,9
	329	37,5	36,7
Norsertalina	29	38	26,5
	58	38	26,5
Paroxetina	88	10	7,6
	254	25	9,53

Los resultados obtenidos para cada analito se muestran en la **Tabla IV.10**. Como se observa en dicha tabla, los resultados muestran una diferencia coherente entre BCF_k y BCF_{48h}. Los valores de BCF encontrados son, en la mayoría de ocasiones, muy similares a los encontrados en la bibliografía de ensayos similares. Silva et al. (2016) realizaron estudios sobre la acumulación en tejidos de mejillón (*Mytilus galloprovincialis*) expuestos a una concentración nominal de fluoxetina (75 ng·mL⁻¹) durante 15 días y ajustan los datos experimentales al mismo modelo utilizado en el presente estudio, obteniendo un factor de bioacumulación de 129¹⁶⁴. Es de destacar que los mejillones, con frecuencia, muestran patrones de acumulación más altos que los obtenidos por los peces, ya que procesan grandes volúmenes de agua en el que viven para buscar alimentos. Paterson y Metcalfe (2008) estimaron un BCF de 80 en *Japanese medaka* expuesta a una concentración nominal de fluoxetina de 640 ng·L⁻¹ ¹⁶⁵. Valenti et al. (2012)¹⁶⁶ encontraron que peces expuestos a sertralina a tres concentraciones diferentes (3, 11 y 28 ng·L⁻¹) acumularon este producto químico en plasma, encontrando valores de acumulación próximos a 80.

En los experimentos llevados a cabo en este capítulo, se observó, en concordancia con los datos bibliográficos, una baja bioacumulación de los cuatro compuestos parentales antidepresivos y sus tres metabolitos y, además, no pudiéndose considerar compuestos bioacumulativos según la normativa REACH (BCFs superiores a 2000). Esto puede deberse a que estos fármacos están diseñados para producir interacciones en rutas específicas en humanos y en animales, por lo que bajos niveles de residuos farmacéuticos pueden alterar procesos metabólicos en los organismos lo que podría tener un riesgo potencial en los diferentes compartimentos ambientales.

En otro experimento llevado a cabo con las larvas de pez cebra expuestas únicamente a una mezcla de los antidepresivos parentales, fluoxetina, sertralina, citalopram y paroxetina, a una concentración nominal de $80 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ y $300 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, se observó una biotransformación de estos compuestos parentales en sus metabolitos, norfluoxetina, norsertralina y desmetilcitalopram, a solo 48 horas de exposición (**Figura IV.14.**). En estos experimentos, la exposición a los compuestos parentales mostró la aparición de sus metabolitos en donde se observa el aumento de concentración a diferentes tiempos de exposición. Estableciendo la relación entre la concentración de metabolito con respecto a la concentración de compuesto parental encontrado en la larva en los diferentes tiempos de exposición (6h, 24h, 45h, 48h), la relación aumenta significativamente, especialmente en los experimentos de bioacumulación llevados a cabo a $300 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, a excepción de la relación entre desmetilcitalopram y citalopram en donde esta relación no es tan acusada y se mantiene prácticamente constante en el ensayo llevado a cabo a una concentración de exposición de $300 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ de cada compuesto parental (**Tabla IV.11.**). Como se menciona en la literatura, los peces son organismos capaces de metabolizar varios fármacos de amplio uso y proporcionar información inicial relacionada con esta conversión funcional en humanos^{164, 167-171}.

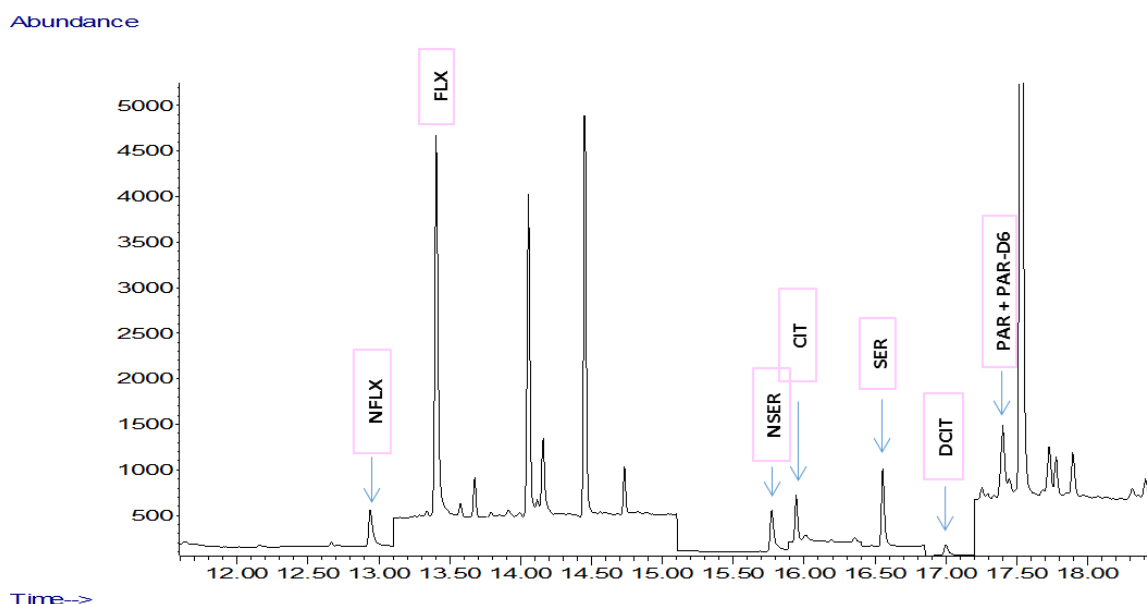


Figura IV.14. Cromatograma obtenido por GC/MS de una muestra de larvas de pez cebra tras 48 horas de exposición a $300 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ de Fluoxetina, Sertralina, Citalopram y Paroxetina.

Tabla IV.11. Variación de la concentración de los metabolitos identificados y relación entre metabolito/compuesto parental en los experimentos de bioacumulación llevados a cabo a $80 \text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ y $300 \text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ de fluoxetina, sertralina, citalopram y paroxetina.

Experimento de bioacumulación a 300 ng mL^{-1}						
	Concentración NFLX observada ($\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$)	Relación NFLX/FLX	Concentración NSER observada ($\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$)	Relación NSER/SER	Concentración DCIT observado ($\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$)	Relación DCIT/CIT
t = 6h	64.9	0.24	141.4	0.17	117.58	0.47
t = 24h	280.4	0.30	1228.7	0.18	296.57	0.78
t = 45h	1032.3	0.74	1968.2	0.41	202.68	0.15
t = 48h	1225.3	0.92	2594.7	0.47	123.05	0.26
Experimento de bioacumulación a 80 ng mL^{-1}						
	Concentración NFLX observada ($\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$)	Relación NFLX/FLX	Concentración NSER observada ($\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$)	Relación NSER/SER	Concentración DCIT observado ($\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$)	Relación DCIT/CIT
t = 6h	17.8	0.14	44.4	0.17	8.9	0.07
t = 24h	488.3	1.02	504.0	0.12	10.1	0.06
t = 45h	403.9	0.91	751.8	0.33	14.3	0.15
t = 48h	382.4	0.83	731.3	0.16	32.3	0.54

A la vista de los resultados obtenidos, se observa que la exposición a fluoxetina, sertralina, citalopram y paroxetina a las concentraciones de 80 y 300 ng·mL⁻¹ de cada analito muestra una biotransformación a sus metabolitos, norfluoxetina, norsertralina y desmetilcitalopram desde la muestra inicial a 6 horas hasta llegar a un máximo en un tiempo de 48 horas. Este resultado obtenido está en consonancia a lo descrito en la bibliografía. Silva et al. (2012) encontraron que la fluoxetina se metaboliza tras la administración oral por medio de una isozima del citocromo P450, CYP2D6, en el metabolito activo principal, la norfluoxetina. En este estudio, la fluoxetina acumulada en tejidos de mejillón (*Mytillus galloprovincialis*) expuestos a una concentración nominal de fluoxetina de 75 ng·L⁻¹ durante 15 días, dio lugar a niveles de norfluoxetina que fueron aumentando durante el período de exposición, encontrando proporciones de norfluoxetina/ fluoxetina de 0.12, 0.64 y 1.25 a los 3, 7 y 15 días de exposición, respectivamente¹⁶⁸. En peces de agua dulce Japanese medaka (*Oryzias latipes*) expuestos a fluoxetina (640 ng·L⁻¹) durante 7 días presentaron concentraciones de norfluoxetina inferiores a las encontradas de fluoxetina hasta el día 7, momento en el que la concentración media del metabolito (64.3 ± 8.7 ng·g⁻¹, w.w.) fue más alta que fluoxetina (40.8 ± 5.0 ng·g⁻¹, w.w.)¹⁶⁵. Por otro lado, Nakamura et al. (2008), encontraron proporciones de norfluoxetina y fluoxetina de 5.3 y 1.1 en diferentes partes de pez expuesto a 30 mg·L⁻¹ y 300 mg·L⁻¹, respectivamente, durante 30 días¹⁷².

Smith et al. (2010), tras la incubación in vitro de fluoxetina con microsomas hepáticos de trucha arcoiris, observó que la pérdida de este fármaco fue mayor que la producción de norfluoxetina, lo que parece indicar que este metabolito no es el producto predominante de biotransformación de fluoxetina en peces y, por ello, reclama una investigación adicional para identificar complementemente otros metabolitos, además de la norfluoxetina¹⁷⁰. Otros estudios realizados con microsomas hepáticos humanos in vitro demostraron que el fármaco citalopram también se metaboliza por otra isozima del citocromo P450 a N-desmetilcitalopram, que es de 5 a 10 veces más activo que su fármaco original en la inhibición de la CYP2D6 y es casi tan potente como la fluoxetina en la inhibición de 2-hidroxilación de imipramina in vitro en dicho modelo¹⁷³. Esto se podría relacionar con el hecho de haber encontrado picos desconocidos a lo largo de todos los

cromatogramas obtenidos en cada ensayo de bioacumulación, lo que abre una posible vía de investigación para identificar otros metabolitos de interés.

**Determinación de residuos farmacéuticos en
alimentos y muestras medioambientales.
Evaluación de su toxicidad con larvas de pez
cebra.**

**V. Aplicación de la metodología analítica
desarrollada para determinar NSAIDs,
reguladores lipídicos y SSRIs en muestras
alimentarias.**

En este capítulo se describe el desarrollo y mejora de las metodologías analíticas descritas en los Capítulos III y IV, para identificar y cuantificar NSAIDs, reguladores lipídicos y SSRIs en productos manufacturados derivados del pescado.

V.1. INSTRUMENTACION, REACTIVOS Y MUESTRAS

V.1.1. Instrumentación

El proceso de extracción de los diferentes fármacos se asiste con el uso de una sonda de ultrasonidos Vibra Cell (VCx130), provista de una punta de titanio de 2 mm de diámetro y generador de alta frecuencia de 130W a 20 KHz.

La limpieza de los extractos o etapa de clean-up se lleva a cabo con empleo de vórtex Genie-2 (Scientific Industries) y microcentrífuga modelo 5415R (Eppendorf). La evaporación del disolvente de los diferentes extractos se llevó a cabo empleando una caja de vacío acoplada a una bomba de vacío modelo N035AN.18 en la que se emplea N₂ (N₂ técnico X50S) y un evaporador constituido por una caja de vacío de 20 posiciones (VacElut 20-place vacuum, Varian).

Para analizar y cuantificar los analitos de interés en las muestras seleccionadas de tejido de trucha, se ha utilizado un cromatógrafo de gases modelo 7890A (Agilent Technologies, Madrid, España), equipado con un inyector (autoinyector modelo HP 7683B Series) acoplado a un detector MSD de espectrometría de masas (detector HP 5975C VL MSD, Agilent Technologies, Madrid, España) dispuesto de un cuadrupolo como analizador de masas. El sistema GC-MS es equipado con una columna capilar de polidimetilsiloxano (95%) entrecruzada, ZB-5 (30 m x 0.25 mm I.D., 0.25 mm), de Phenomenex, usando helio (Pureza > 99.999%) a 1 mL·min⁻¹ como gas portador. ChemStation es utilizado como software para el tratamiento de los resultados. Las condiciones instrumentales utilizadas en el desarrollo del método se incluyen en la **Tabla V.1.**

Tabla V.1. Condiciones instrumentales utilizadas en el sistema cromatográfico de GC-MS.

T ^a de la fuente de iones	230°C
T ^a Cuadrupolo	150°C
T ^a línea de transferencia	280°C
Rango de masas (modo SCAN)	m/z 50-550

V.1.2. Reactivos

La **Tabla V.2.** muestra los fármacos, reactivos (grado HPLC) y sorbentes utilizados en el desarrollo del método.

Tabla V.2. Fármacos, reactivos y sorbentes empleados en el desarrollo del método analítico.

COMPUESTO	Fórmula empírica/ CASA COMERCIAL
Ácido clofíbrico (CFB)	2-(p-chlorophenoxy)-2-methylpropioniac acid (Sigma Aldrich)
Ibuprofeno (IBU)	(±)-2-(4-isobutylphenyl)propanoic acid (Sigma Aldrich)
Naproxeno (NP)	(S)-(+)-2-(6-methoxy-2-naphthyl)propionic acid (Sigma Aldrich)
Sal de diclofenaco sódico	2 - [(2 , 6 - dichlorophenyl)amino]benzeneacetic acid sodium salt (Sigma Aldrich)
Triclosan (TRI) (SI)	5-chloro-2-(2,4-dichlorophenoxy)phenol (Sigma Aldrich)
Fluoxetine hydrochloride (FLX))	(±)-N-Methyl-γ-[4-(trifluoromethyl)phenoxy]benzenepropanamine hydrochloride (Sigma Aldrich)
Sertraline hydrochloride (SER)	(1S,4S)-4-(3,4-Dichlorophenyl)-1,2,3,4-tetrahydro-N-methyl-1-naphthalenamine hydrochloride (Sigma Aldrich)
Citalopram hydrobromide (CIT)	1-[3-(Dimethylamino)propyl]-1-(4-fluorophenyl)-1,3-dihydro-5-isobenzofurancarbonitrile hydrobromide (Sigma Aldrich)
Paroxetine hemihydrate (PAR)	(3S-trans)-3-[(1,3-Benzodioxol-5-yloxy)methyl]-4-(4-fluorophenyl)piperidine hydrochloride hemihydrate (Sigma Aldrich)
Norfluoxetine hydrochloride (NFLX)	(±)-γ-(4-Trifluoromethylphenoxy)benzenepropanamine hydrochloride (Sigma Aldrich)
Norsertraline hydrochloride solution (NSER)	(Sigma Aldrich)
Desmethylocitalopram hydrochloride solution (DCIT)	(Sigma Aldrich)
Paroxetine D6 maleate solution (PAR-d6)	(Sigma Aldrich)
MTBSTFA + 1% TBDMCS	N-tert-butyldimethylsilyl-N-methyltrifluoroacetamide 1 % tertbutyldimethylchlorosilane (Sigma Aldrich)
Heptafluorobutyric imidazole (HFBI)	1-(Perfluorobutyryl) imidazole

	Sigma Aldrich
Acetonitrilo (AcN)	(Lab-Scan)
Acetato de etilo (AcOEt)	(Lab-Scan)
Metanol (MeOH)	(Scharlau)
Tolueno	(Panreac)
Hexano	(Panreac)
Acetona	(Scharlau)
Silica gel	(Agilent Technologies)
C₁₈	(Agilent Technologies)
PSA	(Agilent Technologies)
Florisil	(Sigma Aldrich)
MgSO₄	(Agilent Technologies)
Zsep	(Sigma Aldrich)
Graphitized carbon black (GCB)	(Sigma Aldrich)
Agua MilliQ	-

Se prepararon soluciones stocks de los siete antidepresivos a una concentración de 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ en metanol. La solución stock del estándar interno Paroxetina-d₆, se preparó a la concentración de 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ en metanol. En el caso de los antiinflamatorios no esteroideos y ácido clofíbrico como regulador lipídico, se prepararon soluciones stocks a la concentración de 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ en metanol. El reactivo triclosán preparado a la concentración de 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ en metanol se utilizó como patrón interno.

Las soluciones de stock de cada fármaco testado se conservaron en oscuridad a -18°C. Las soluciones stocks son estables, al menos, durante 2 meses. Todas las soluciones de trabajo se prepararon diariamente por dilución a partir de la solución stock en el mismo disolvente.

Las muestras de trucha y productos manufacturados derivados del pescado (ralladura de mar (Pescanova), palitos de mar (Eroski), muslitos de mar (Eroski) y salchichas de mar (Pescanova) utilizados en este trabajo se obtuvieron en supermercados de la localidad de Madrid.

V.2. METODOLOGÍA ANALÍTICA

V.2.1. Tratamiento de muestras: extracción y limpieza

Se han desarrollado dos métodos analíticos diferentes para determinar varias familias de fármacos ampliamente usadas, en tejidos de trucha y productos manufacturados del pescado: SSRI, NSAIDs y ácido clofíbrico como regulador lipídico. En ambos métodos, debido al alto contenido lipídico de la matriz, es necesario modificar los tratamientos de extracción y limpieza de las muestras descritas en los apartados anteriores.

Para optimizar la etapa de limpieza o clean-up y eliminar el material lipídico co-extraído procedente de la matriz, se han reportado diferentes sorbentes comerciales ampliamente utilizados en la literatura^{141, 144, 145, 147, 174, 175}. Durante el desarrollo del procedimiento analítico para determinar NSAIDs y ácido clofíbrico, se seleccionó C₁₈ como sorbente para limpiar las muestras de acuerdo al estudio desarrollado en el Capítulo III.

Los dos procedimientos analíticos optimizados se clasifican según al tipo de analito que se va a determinar:

Procedimiento 1 Determinación de NSAIDs y ácido clofíbrico en tejido de pescado: para determinar el contenido de antiinflamatorios (ibuprofeno, naproxeno y diclofenaco) y ácido clofíbrico como regulador lipídico, se pesan 100 mg de muestra en un tubo eppendorf al que se añade una cantidad conocida de estándar interno (triclosán) y 500 µL de acetato de etilo como solvente orgánico de extracción. La extracción de los analitos se favoreció con ayuda de la sonda de ultrasonidos durante 1 minuto, sin pulsos y amplitud de 40%, seguido de centrifugación a 14 rcf durante 15 minutos a 15°C. El sobrenadante fue recogido y transferido a un tubo eppendorf para llevar a cabo la etapa de clean-up o limpieza de la muestra. Para ello, se añadieron 150 mg de C₁₈ como sorbente y la eficacia del mismo se favoreció con ayuda de un vórtex durante 30 segundos. El extracto fue filtrado con filtros nylon 0.45 µm y transferido a un vial de HPLC de 4 mL, en donde se evapora hasta sequedad en caja de vacío. El extracto se centrifugó, de nuevo, bajo las mismas condiciones que las descritas anteriormente y el extracto final se trasvasó a un

vial de HPLC de 4 mL, en donde se evaporó la fase orgánica hasta sequedad en la caja de vacío. A continuación, se añadieron 80 μL de acetona y 20 μL de MTBSFTFA + TBDMCS como derivatizante sobre el extracto seco y se derivatizó durante 30 minutos a una temperatura de 70°C. El extracto final (1 μL) que contiene los analitos derivatizados es inyectado en el cromatógrafo de gases. (Ver **Figura V.1.** Método 1).

Procedimiento 2 - Determinación de SSRI en tejidos de pescado: para determinar el contenido de antidepresivos parenterales y sus metabolitos (fluoxetina, sertralina, citalopram, paroxetina, norfluoxetina, nortsertralina y desmetilcitalopram), se pesan 100 mg de muestra en un tubo eppendorf que contiene 150 mg de MgSO_4 al que se añade una cantidad conocida de estándar interno (paroxetina- d_6) y 500 μL de acetonitrilo como disolvente orgánico de extracción. La extracción de los analitos se favoreció con ayuda de la sonda de ultrasonidos durante 1 minuto, sin pulsos y amplitud de 40%, seguido de centrifugación a 14 rcf durante 15 minutos a 15°C. El sobrenadante fue recogido y transferido a un tubo eppendorf donde se llevó a cabo la etapa de clean-up o limpieza de la muestra. Para ello, se añadieron 150 mg de C_{18} como sorbente y la eficacia del mismo se favoreció con ayuda de un vórtex durante 30 segundos. El extracto se centrifugó de nuevo bajo las mismas condiciones que las descritas anteriormente y el extracto se trasvasó a un vial de HPLC de 4 mL, en donde se evaporó la fase orgánica hasta sequedad en la caja de vacío. Se añadieron 100 μL de HFBI como derivatizante y el extracto resultante se derivatizó durante 30 minutos a una temperatura de 85°C. Transcurrido este tiempo, se lleva a cabo una extracción líquido-líquido de los compuestos derivatizados con 500 μL de agua y 2 mL de tolueno. La fase orgánica es evaporada hasta sequedad en la caja de vacío y se redisuelve el extracto seco en 80 μL de tolueno. 1 μL del extracto final es inyectado en el cromatógrafo de gases. (Ver **Figura V.1.** Método 1).

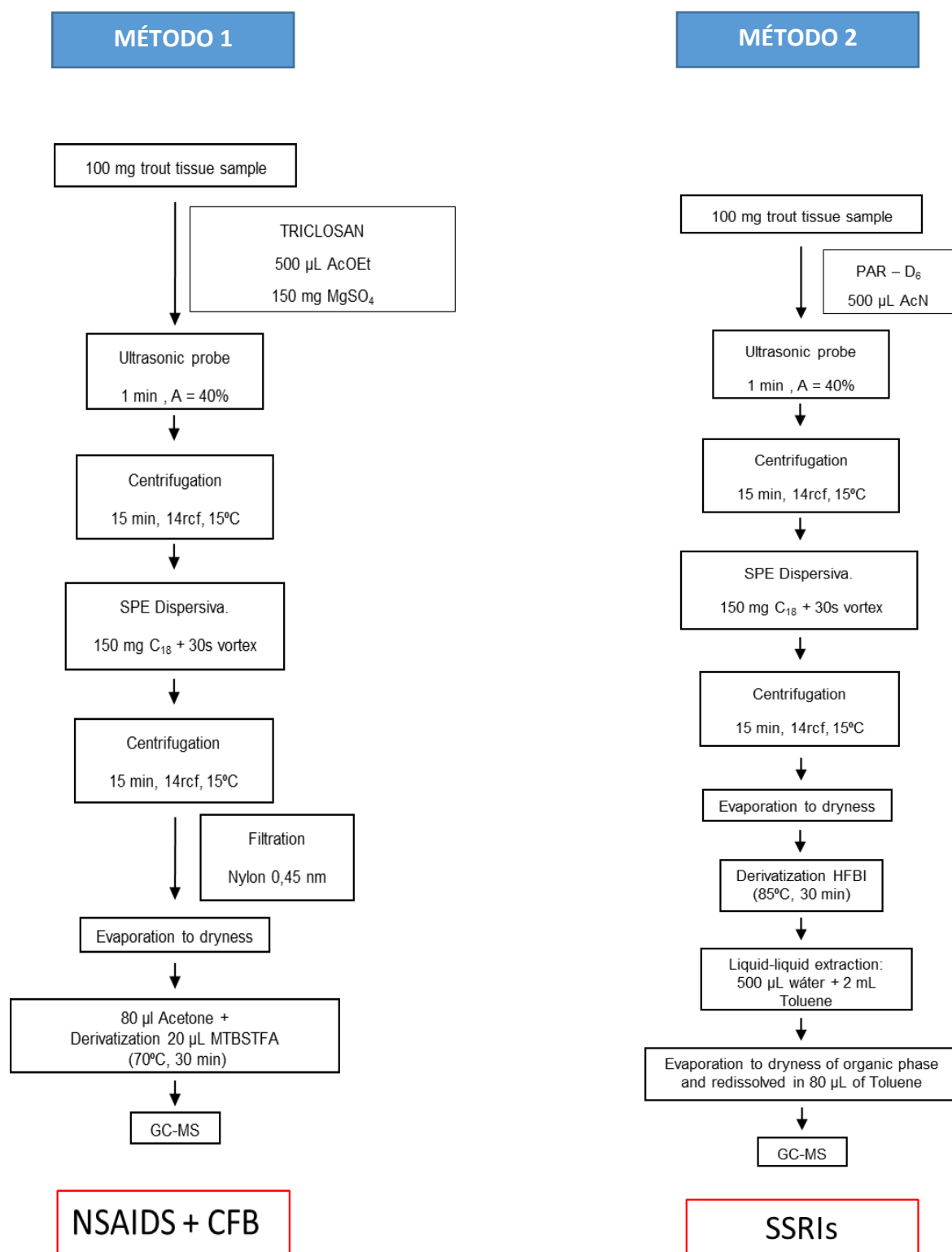


Figura V.1. Diagrama de flujo de cada procedimiento analítico desarrollado en función de la familia de productos farmacéuticos.

V.2.2. Análisis de muestras mediante CG-MS

Siguiendo la estrategia analítica de la extracción y limpieza se han optimizado dos métodos para la separación y cuantificación de los analitos: ibuprofeno, naproxeno, diclofenaco y ácido clofíbrico (método 1) y fluoxetina, sertralina, citalopram y paroxetina y sus metabolitos, norfluoxetina, norsertralina y desmetilcitalopram (método 2). Todos los analitos se han separado y cuantificado mediante GC-MS. La cuantificación se llevó a cabo mediante calibración con patrón interno, siendo triclosán seleccionado como estándar interno óptimo en el método 1 y paroxetina-d₆ el compuesto elegido en el método 2.

Se optimizaron las rampas de temperatura del cromatógrafo para cada familia de fármacos con el fin de conseguir la separación de los analitos (en modo SCAN y modo SIM), y minimizar las interferencias. En las condiciones óptimas, se separaron e identificaron los distintos analitos de cada familia de fármacos en 18 minutos y 21 minutos para NSAIDs y ácido clofíbrico y SSRIs, respectivamente.

Los valores elegidos de las relaciones m/z se obtuvieron de los cromatogramas de disoluciones estándar de cada analito a concentraciones de 1 y 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, en modo SCAN, confirmando cada tiempo de retención y m/z de cada compuesto de forma individual de acuerdo a los experimentos llevados a cabo en el Capítulo III y Capítulo IV de la presente Tesis. A partir de estos datos, se usó un método SIM para cuantificar los analitos testados, usando la suma de área de los iones seleccionados para cada compuesto. Cada compuesto es cuantificado por interpolación en el correspondiente calibrado de patrón interno.

V.2.3. Validación de los métodos propuestos

Los métodos analíticos propuestos para la determinación de los diferentes fármacos en los tejidos de pescado se validaron en términos de exactitud, linealidad, precisión y límites de detección y de cuantificación. Las muestras son tratadas y analizadas acorde al método 1 y 2 descrito en las secciones anteriores para determinar el contenido de NSAIDs y ácido clofíbrico o SSRI, respectivamente. La presencia de efecto matriz se demostró por

comparación estadística entre las pendientes de un calibrado externo y las pendientes de los calibrados en presencia de la matriz para cada analito. La cuantificación de cada analito se hace siempre sobre calibrado en presencia de la matriz interpolando la relación de área entre el área del analito de interés y el área del estándar interno, según corresponda. Las muestras se analizan por triplicado. Los calibrados se preparan de forma diaria.

Se demostró la ausencia de interferencias en los tejidos de pescado sin fortificar a los tiempos de retención de los analitos de interés. Para ello, seis muestras sin fortificar fueron analizadas según el método descrito en las secciones anteriores, no observándose ningún pico cromatográfico a los tiempos de retención de los analitos en ninguna de las muestras.

En ausencia de un material de referencia estándar (CRM) para este tipo de matrices, la exactitud del método se verificó mediante estudios de recuperación. Aplicando los procedimientos experimentales descritos (método 1 y método 2 incluido en las secciones anteriores los límites de detección (LOD) y la cuantificación (LOQ) se calculan a partir de la 3 o 10 la desviación estándar obtenida del análisis de la muestra fortificada al nivel más bajo del calibrado con respecto a la pendiente obtenida del mismo, respectivamente, utilizando el valor de desviación estándar de la calibración del punto más bajo, $100 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ para NSAIDs y $50 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ para antidepresivos SSRIs.

Se evaluó la reproducibilidad y precisión a partir de un calibrado en presencia de la matriz en un rango de concentración entre $0\text{-}500 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ para NSAIDs y ácido clofíbrico y $0\text{-}1000 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ para antidepresivos en cada procedimiento analítico (triclosán es utilizado como estándar interno en el método 1 y paroxetina- d_6 en el método 2). Para ello, se prepararon tres réplicas de tejido de trucha fortificadas a dos niveles de concentración: 150 y $500 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ para antidepresivos y 150 y $250 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$. La relación de señales obtenidas entre el área del analito de interés y el área del estándar interno se interpola en la curva de calibración en presencia de la matriz obtenida para cada analito. La reproducibilidad se evaluó con análisis de recuperación en el mismo día y en días diferentes.

V.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se siguieron los métodos propuestos en los Capítulos III y Capítulo IV de la presente Tesis Doctoral, para determinar NSAIDs y SSRIs en las muestras de pescados manufacturados.

V.3.1. Optimización de la separación cromatográfica y condiciones de derivatización

Inicialmente, se comenzó con la optimización de la separación cromatográfica mediante el análisis de soluciones estándar de $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ tratadas bajo el método 1 y método 2 y una rampa de temperatura inicial a partir de la literatura^{26,130}. Se evaluaron diferentes rampas de temperatura a partir de los gradientes optimizados en el Capítulo III y Capítulo IV de la presente Tesis para cada familia de fármacos de tal manera que se consiguió obtener una buena separación de los analitos y del estándar interno, en modo SCAN y modo SIM, y minimizar las interferencias por parte de la matriz acortando los tiempos de análisis en el caso de los NSAIDs y ácido clofíbrico (el tiempo total de análisis propuesto en el Capítulo III era de 22 minutos consiguiéndolo reducir a 18 minutos en el Capítulo presente) mientras que el tiempo de análisis establecido para determinar SSRIs en el Capítulo IV (18.5 min) tuvo que ser modificado a un tiempo mayor por la presencia de interferencias asociadas a la matriz (21 min). La **Tabla V.3.** y **V.4.** muestran los gradientes de temperatura óptimos seleccionados para el análisis de las muestras de tejido de trucha para cada una de las familias de fármacos.

Tabla V.3. Gradiente de temperatura optimizado para el análisis de NSAIDs y ácido clofíbrico.

NSAIDs y Ácido clofíbrico		
Rampa	Temperatura (°C)	Tiempo de espera (min)
-	80°C	1 min
20°C/min	120°C	-
10°C/min	200°C	-
20°C/min	280°C	3 min
Tiempo total de análisis: 18 minutos		
Tiempo de retardo: 10 min		

Tabla V.4. Gradiente de temperatura optimizado para el análisis de SSRIs.

SSRIs		
Rampa	Temperatura (°C)	Tiempo de espera (min)
-	90°C	1 min
15°C/min	180°C	2 min
10°C/min	260°C	1 min
20°C/min	300°C	1 min
Tiempo total de análisis: 21 minutos		
Tiempo de retardo: 12.5 min		

La evaluación del estándar interno para la determinación de NSAIDs y ácido clofíbrico en el método 1, estuvo basada en la experiencia previa del grupo de investigación, por lo que el triclosán fue mantenido como estándar interno en el método 1 acorde a lo descrito en el Capítulo III de la presente Tesis Doctoral y paroxetina-d₆ como estándar interno del método 2 según Capítulo IV^{76, 143}.

Una vez seleccionado el estándar interno óptimo en cada método, los valores de m/z concluidos del Capítulo III y Capítulo IV de la presente Tesis, son verificados en blancos de muestra de tejido de trucha fortificadas a las concentraciones de 1 y 5 µg·mL⁻¹ de cada analito de interés, tratadas acorde al método 1 o 2, según corresponda y analizadas por GC-MS en modo SCAN. La identificación de todos los analitos en muestras de tejido de trucha se basó en la comparación de los tiempos de retención obtenidos a partir de soluciones estándar y los obtenidos para cada compuesto en las muestras fortificadas a través del método SIM. Este método fue usado para confirmar el tiempo de retención, valores de área y las m/z seleccionadas de cada compuesto testado. Los valores de m/z obtenidos del espectro de masas para cada analito se muestran en las **Tablas V.5. y V.6.** Los valores de m/z obtenidas están en concordancia con la literatura^{26,128-130}. En comparación con los valores de m/z obtenidos en Capítulo III y Capítulo IV, las m/z concluidas para la determinación de NSAIDs y ácido clofíbrico se mantienen, no teniendo ninguna interferencia asociada al tiempo de retención de interés de cada analito testado. Sin embargo, en el caso de los SSRIs, todas los valores de m/z se mantienen salvo para citalopram y nortsertralina, en donde se ha eliminado la m/z 324 y se ha añadido el valor de m/z 487, respectivamente.

Tabla V.5. Valores de t_R y m/z establecidos para cada NSAIDs y ácido clofibrico mediante GC-MS.

MÉTODO NSAIDs y CFB		
COMPUESTO	t_R (min)	m/z
Ácido clofibrico	11.7	143, 271, 273
Ibuprofeno	12.1	161, 263, 264
Naproxeno	14.9	185, 188, 287
Triclosán	15.2	200, 345, 347
Diclofenaco	16.3	352, 214, 409

Tabla V.6. Valores de t_R y m/z establecidos para SSRI mediante GC-MS.

MÉTODO SSRIs		
COMPUESTO	t_R (min)	m/z
Norfluoxetina	13.7	117, 330
Fluoxetina	14.4	117, 169, 240, 344
Norsertalina	17.7	274, 276, 487
Citalopram	18.2	58, 238
Sertralina	18.9	274, 276, 501
Desmetilcitalopram	19.6	238
Paroxetina	20.2	109, 135, 525
Paroxetina-D ₆		111, 137, 531

V.3.2. Determinación de NSAIDs y SSRIs en muestras de pescados manufacturados

Una vez que se establecieron las condiciones experimentales óptimas de la separación cromatográfica y las condiciones de derivatización, se inició la optimización de la etapa de tratamiento y limpieza o clean-up en las muestras de alimentos, seleccionándose el tejido de trucha como muestra diana para realizar este estudio.

V.3.2.1. Optimización del tratamiento de muestra en tejido de trucha

La dificultad que conlleva el trabajo con peces, en comparación con los llevados a cabo en los capítulos anteriores, sucedáneo de caviar y larvas, se debe a la complejidad asociada de la matriz, dado su alto contenido graso que puede provocar numerosas interferencias y originar picos cromatográficos a los tiempos de retención de los compuestos testados. Por este motivo, el objetivo principal de esta etapa es minimizar el impacto de las

interferencias que puedan extraerse de la matriz y su efecto en su análisis posterior, por lo que es necesario optimizar esta etapa la cual está basada en la extracción de los compuestos de la matriz así como la obtención de extractos limpios para poder determinar y cuantificar los analitos de interés en ausencia o mínimo efecto matriz. Para este propósito, se evaluaron las condiciones más adecuadas en la etapa de extracción en fase sólida dispersiva o método QuEChERS en la cual se optimizó el disolvente de extracción y se evaluaron diferentes sorbentes en la etapa de limpieza con el objetivo de obtener mayores recuperaciones de cada analito y mínima co-extracción de interferentes.

a) Método 1: NSAIDs y ácido clofíbrico

Para determinar ibuprofeno, naproxeno, diclofenaco y ácido clofíbrico, se llevó a cabo la optimización de la etapa de extracción y limpieza según un método de extracción en fase sólida dispersiva y método QuEChERS modificado. Para este propósito, se evaluó tanto el disolvente orgánico, el cual permite extraer los analitos de interés, y como el sorbente de la muestra, el cual permite eliminar interferentes procedentes de la matriz y obtener extractos limpios en ausencia de interferencias en su análisis cromatográfico posterior.

Para ello, las muestras de tejido de trucha se fortificaron con los cuatro analitos y triclosán como estándar interno a la concentración de $150 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ y $250 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ (tres réplicas por concentración), respectivamente, y se llevó a cabo la extracción con $500 \mu\text{L}$ de los disolventes utilizados en los capítulos anteriores acetonitrilo y acetato de etilo. La extracción se realizó con el uso de la sonda de ultrasonidos (40% de amplitud durante 1 minutos) o con el uso de vórtex (30 segundos)¹⁷⁶. Los resultados obtenidos se recogen en la **Tabla V.7**. En el caso de acetonitrilo como solvente, las recuperaciones fueron próximas al 100% para todos los compuestos utilizando vórtex o sonda de ultrasonido, excepto para diclofenaco, cuyas recuperaciones fueron superiores al 120% en ambos casos. Probablemente, esta recuperación tan elevada esté asociada a una interferencia extraída de la matriz que presente el mismo tiempo de retención que el tiempo de retención de diclofenaco, lo que fue comprobado con blancos de tejido de trucha sin dopar, extraídos con acetonitrilo. Sin embargo, las recuperaciones obtenidas usando acetato de etilo como solvente de extracción, permitieron obtener recuperaciones

próximas al 100% para todos los analitos estudiados usando sonda de ultrasonidos o vórtex para favorecer la extracción de los compuestos. Solo en el caso de naproxeno, la recuperación fue de 83% cuando la extracción fue favorecida con el uso de vórtex. Sin embargo, naproxeno extraído con acetato de etilo y uso de sonda de ultrasonidos durante la etapa de extracción permitió obtener una recuperación del 90%. El cromatograma obtenido con acetato de etilo presentaba menor número de interferencias asociadas con el contenido lipídico co-extraído en comparación con el cromatograma de las muestras extraídas con acetonitrilo. Además, muestras fortificadas con 400 ng·g⁻¹ de cada analito y 250 ng·g⁻¹ de triclosán (SI) fueron extraídas con el mismo método y se evaluaron recuperaciones de cada compuesto de interés (**Tabla V.7.**). Como ejemplo, en la **Figura V.2.**, se muestra un cromatograma obtenido de una muestra de tejido de trucha fortificada con 400 ng·g⁻¹ de cada analito y 250 ng·g⁻¹ de triclosán (SI).

Por este motivo, se seleccionó el acetato de etilo como solvente óptimo de extracción en base a las recuperaciones obtenidas y la presencia mínima de interferencias a lo largo del cromatograma. C₁₈ fue usado como sorbente inicial para la evaluación del disolvente de extracción en las muestras de tejido de trucha.

Cabe destacar que el empleo de acetato de etilo como extractante supone una modificación sobre los métodos descritos en los capítulos anteriores, posiblemente, ello se deba a su menor polaridad, lo que disminuye la co-extracción de componentes lipídicos presentes en la matriz.

Tabla V.7. Recuperaciones obtenidas para NSAIDs y ácido clofíbrico durante la optimización de la etapa de extracción en muestras fortificadas con los cuatro analitos y triclosán como estándar interno a la concentración de 150 ng·g⁻¹ y 250 ng·g⁻¹, respectivamente (n = 3).

Acetonitrilo				
	CFB	IBU	NP	DC
USP	101 ± 3	97 ± 4	102 ± 2	103 ± 5
Vórtex	98 ± 1	95 ± 4	104 ± 6	123 ± 6
Acetato de Etilo				
	CFB	IBU	NP	DC
USP	107 ± 7	101 ± 3	90 ± 2	98 ± 5
Vórtex	97 ± 5	102 ± 1	83 ± 3	108 ± 7

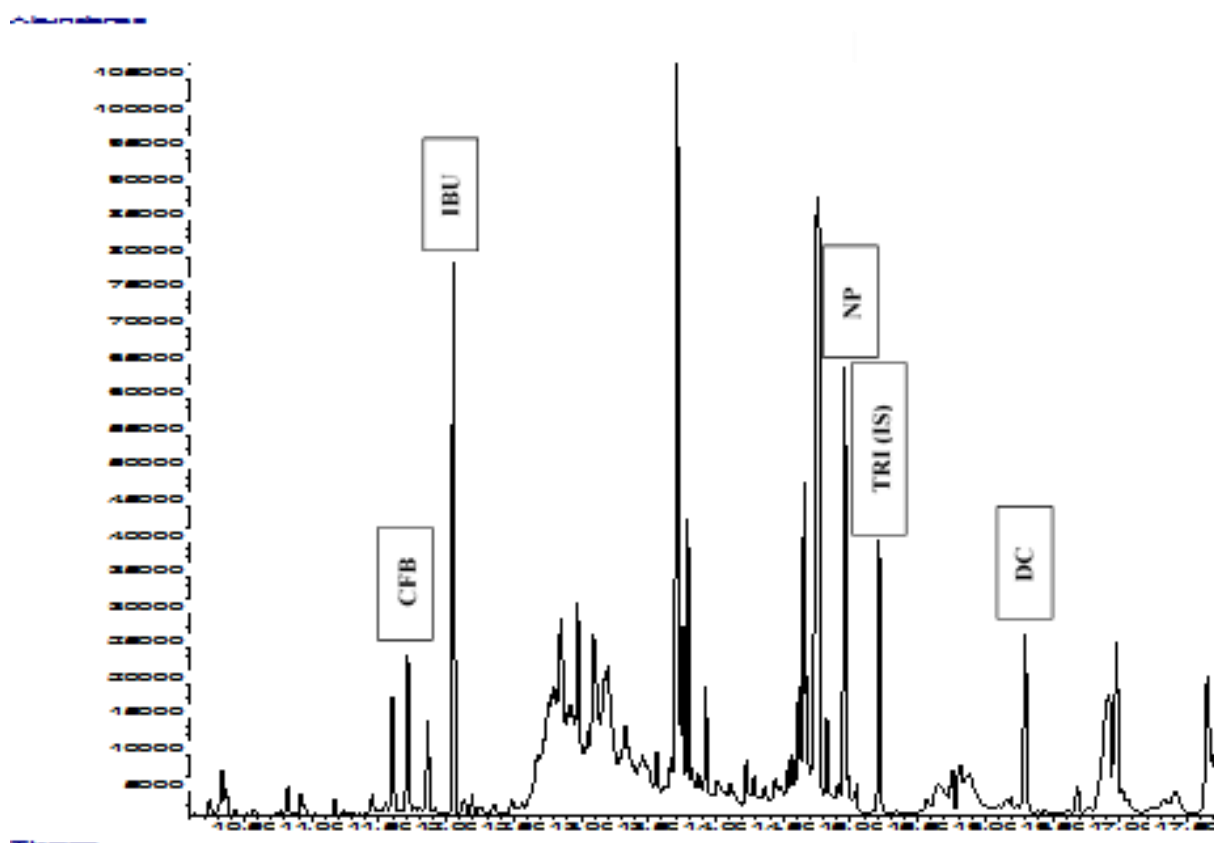


Figura V.2. Cromatograma obtenido de una muestra de tejido de trucha fortificada con $400 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ de cada analito y $250 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ de triclosán (SI) tratada con las condiciones optimizadas en este método analítico.

a) Método 2: SSRIs

Para determinar los analitos antidepresivos pertenecientes a la familia de fármacos inhibidores de la recaptación de la serotonina, se evaluó un método similar al método QuEChERS en el cual la muestra de tejido de trucha es extraída con un solvente orgánico y se le adicionaron 150 mg de MgSO_4 , calculándose las recuperaciones de cada analito una vez llevado a cabo el análisis mediante CG-MS, lo que nos permitiría establecer la eficiencia de la extracción y la influencia de la matriz^{144,174}. Para ello, se evaluaron diferentes disolventes de extracción ($500 \mu\text{L}$ de acetonitrilo y de acetato de etilo) en blancos de muestras de tejido de trucha y muestras fortificadas con $150 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ de cada analito y $250 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ de paroxetina- d_6 (SI) y la extracción fue favorecida con el uso de sonda de ultrasonidos al 40% de amplitud durante 1 minutos en comparación con el empleo de vórtex durante 30 segundos (tres réplicas). Las recuperaciones obtenidas llevando a cabo la extracción con vórtex fueron inferiores a las obtenidas con la sonda de ultrasonidos, por lo que fue descartada. Además, se obtuvieron recuperaciones más bajas y señales no reproducibles utilizando acetato de etilo como solvente de extracción, por lo

que se seleccionó acetonitrilo como solvente óptimo de extracción favorecido con sonda de ultrasonidos, en donde se obtuvieron recuperaciones superiores al 85% en todos los compuestos analizados.

La etapa de clean-up o limpieza del extracto fue optimizada. Para este propósito, se analizaron blancos y muestras fortificadas a la concentración de $150 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ de cada antidepresivo y $500 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ de paroxetina- d_6 (SI) acorde al método 2 descrito en las secciones precedentes y se evaluaron las siguientes condiciones:

- a) Solvente de extracción: acetonitrilo ($500 \mu\text{L}$), C_{18} como sorbente y sonda de ultrasonidos.
- b) Solvente de extracción: acetonitrilo ($500 \mu\text{L}$), 150 mg de MgSO_4 , C_{18} como sorbente y sonda de ultrasonidos. La presencia de MgSO_4 fue evaluada para ver su influencia.
- c) Solvente de extracción: acetonitrilo ($500 \mu\text{L}$), PSA como sorbente y sonda de ultrasonidos.
- d) Solvente de extracción: acetonitrilo ($500 \mu\text{L}$), carbón activo como sorbente y sonda de ultrasonidos.
- e) Solvente de extracción: acetonitrilo ($500 \mu\text{L}$), florisil como sorbente y sonda de ultrasonidos.

Las recuperaciones obtenidas en cada caso se recogen en la **Tabla V.8**. Inicialmente, comparando el método a y b, diferenciados únicamente por la adición de MgSO_4 , se observó que el empleo de sulfato de magnesio no producía efecto sobre las recuperaciones obtenidas sin MgSO_4 , por lo que fue descartado. Los cromatogramas obtenidos para PSA y carbón activo mostraban picos interferentes. En el caso del Florisil, se obtuvo un cromatograma limpio en ausencia de interferencias a los tiempos de retención de interés. Florisil y C_{18} reducen considerablemente el efecto matriz y minimizan la presencia de compuestos interferentes en los extractos analizados. Además, se estudió, usando acetonitrilo como solvente de extracción, si una mezcla de ambos sorbentes en proporción 50:50 mejoraba la etapa de limpieza. En este caso, los extractos de blancos presentaban cromatogramas muy limpios pero las recuperaciones en

muestras fortificadas con $150 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ de cada antidepresivo y $500 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ de paroxetina- d_6 (SI), no fueron satisfactorias en comparación con el uso de cada sorbente de forma individual como se observa en los valores que se reflejan en la **Tabla V.8**. La combinación de Florisil + C_{18} dieron lugar a recuperaciones $<50\%$ en todos los casos muy posiblemente asociado a pérdida de los analitos durante el proceso de limpieza. Los extractos más limpios junto con recuperaciones superiores al 85% fueron obtenidas usando acetonitrilo como solvente de extracción y C_{18} como adsorbente en la etapa de limpieza de la muestra, por lo que estas condiciones fueron seleccionadas como las óptimas, lo cual presenta múltiples ventajas ya que es un sorbente económico que proporciona recuperaciones cercanas al 100% y reduce notablemente la presencia de sustancias interferentes. Es de destacar que en el caso de la determinación de SSRI en pescado, el método propuesto no difiere del descrito para determinar estos analitos en matrices más sencillas.

Tabla V.8. Recuperaciones obtenidas para SSRIs durante la optimización de la etapa de extracción en muestras fortificadas con los cuatro analitos y sus tres metabolitos y paroxetina- d_6 como estándar interno a la concentración de $150 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ y $500 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$, respectivamente ($n = 3$).

COMPUESTO	C18	FLORISIL	C18 + FLORISIL
Norfluoxetina	100.4 ± 2.6	31 ± 17	39 ± 5
Fluoxetina	93.0 ± 3.2	30 ± 14	40 ± 6
Norsertralina	96.2 ± 3.5	53 ± 11	36 ± 5
Citalopram	98.0 ± 5.7	12 ± 1	41 ± 11
Sertralina	100.0 ± 2.4	31 ± 9	49 ± 4
Desmetilcitalopram	96.8 ± 1.8	10 ± 5	21 ± 5
Paroxetina	99.0 ± 4.0	54 ± 6	35 ± 3

Estas recuperaciones fueron obtenidas por interpolación de la relación de área entre cada analito con el estándar interno en un calibrado en presencia de la matriz para cada analito desde $0\text{-}1000 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ y $500 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ de paroxetina- d_6 en todos los niveles de concentración.

Con estos resultados se demuestra que la metodología desarrollada para cada procedimiento es adecuada para la determinación de NSAIDs y ácido clofíbrico mediante el método 1 y SSRIs en el método 2.

V.3.3. Características analíticas de los métodos propuestos: Validación

Las características analíticas que se determinaron con el fin de validar los métodos propuestos para cuantificar NSAIDs, ácido clofíbrico (método 1) y SSRIs (método 2) en muestras de trucha fueron: linealidad de la curva de calibración, límites de detección y cuantificación, exactitud (a través del % de recuperación) y precisión.

Las muestras de trucha una vez fortificadas con los analitos, se almacenaron en congelador en condiciones de oscuridad durante 24 horas, aproximadamente, para permitir la interacción del analito-matriz. Los analitos fueron extraídos y analizados por GC-MS bajo las condiciones descritas en las secciones descritas anteriormente.

- Linealidad:

Inicialmente se analizaron seis muestras de tejido de trucha no fortificadas con los analitos mediante CG-MS, comprobándose que a los tiempos de retención de los fármacos de interés no presentaban ningún pico cromatográfico asociado a la matriz. La linealidad de los calibrados de patrón interno se investigó para concentraciones de NSAIDs hasta $500 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ y hasta de $1000 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ para los antidepresivos. En todos los casos, se minimizó el efecto matriz interpolando sobre los calibrados en presencia de la misma para cada analito, los cuales fueron lineales, con valores de coeficientes de correlación (r^2) > 0.995 .

- Límites de detección y cuantificación:

Se calcularon los límites de detección (LODs) y límites de cuantificación (LOQs) para cada analito a partir de las curvas de calibrado y de la desviación estándar de la concentración mínima en la que se ha llevado a cabo el calibrado (3s y 10s para LOD y LOQ, respectivamente). Los resultados de LOD y LOQ obtenidos para cada analito se recogen en la **Tabla V.9**.

Tabla V.9. LOD y LOQs obtenidos para NSAIDs, ácido clofibríco y SSRIs obtenidos según los métodos analíticos propuestos.

NSAIDs y Ácido clofibríco		
COMPUESTO	LOD (ng·g ⁻¹)	LOQ (ng·g ⁻¹)
Ácido clofibríco	8,5	28,3
Ibuprofeno	6,2	20,8
Naproxeno	10,9	36,5
Diclofenaco	21,0	69,8
SSRIs		
COMPUESTO	LOD (ng·g ⁻¹)	LOQ (ng·g ⁻¹)
Norfluoxetina	4,3	14,4
Fluoxetina	6,1	20,3
Norsertalina	3,5	11,7
Sertralina	5,0	16,7
Desmetilcitalopram	1,2	4,2
Citalopram	7,9	26,4
Paroxetina	34,5	114,9

- Exactitud y precisión:

La exactitud de los métodos que se proponen se llevó a cabo mediante estudios de recuperación de los distintos analitos en las muestras de trucha fortificadas a dos niveles de concentración en cada analito: 150 ng·g⁻¹ y 250 ng·g⁻¹ de cada NSAIDs y ácido clofibríco (250 ng·g⁻¹ de triclosán como SI) y 150 ng·g⁻¹ y 500 ng·g⁻¹ de cada SSRI (500 ng·g⁻¹ de PAR-d como SI). Los porcentajes de recuperación se muestran en la **Tabla V.10.**, como se pueden observar en todos los casos son muy satisfactorios, estando comprendidos entre 93 y 114 %. La precisión se evaluó realizando el análisis sobre cinco muestras con ensayos analizados en el mismo día (**Tabla V.10.**).

Tabla V.10. Precisión entre días (inter-day) obtenidos para cada analito testado en muestras de tejido de trucha (100 mg) fortificadas a dos niveles de concentración $150 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ y $250 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ de cada NSAIDs y ácido clofíbrico ($250 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ de triclosán como SI) analizadas según método 1 y $150 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ y $500 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ de cada SSRI ($500 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ de triclosán como SI) analizadas acorde al método 2.

NSAIDs y ácido clofíbrico						
Muestras de tejido de trucha	Precisión entre días					
	$150 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$			$250 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$		
	Concentración encontrada ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)	RSD,% (n=5)	%R	Concentración encontrada ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)	RSD,% (n=5)	%R
Ácido clofíbrico	171 ± 10	6%	114 ± 7	265 ± 15	6%	106 ± 6
Ibuprofeno	161 ± 11	6%	108 ± 7	260 ± 8	2%	104 ± 3
Naproxeno	149 ± 15	10%	99 ± 10	245 ± 12	5%	98 ± 5
Diclofenaco	145 ± 17	11%	97 ± 11	235 ± 12	11%	94 ± 5
SSRIs						
Muestras de tejido de trucha	Precisión entre días					
	$150 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$			$500 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$		
	Concentración encontrada ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)	RSD,% (n=5)	%R	Concentración encontrada ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)	RSD,% (n=5)	%R
Norfluoxetina	151 ± 4	3%	100 ± 3	486 ± 21	4%	97 ± 4
Fluoxetina	139 ± 5	3%	93 ± 3	497 ± 21	4%	99 ± 4
Norsertralina	144 ± 5	4%	96 ± 3	502 ± 14	3%	100 ± 3
Sertralina	150 ± 4	2%	100 ± 2	492 ± 28	6%	98 ± 6
Desmetilcitalopram	146 ± 3	2%	97 ± 2	489 ± 27	6%	98 ± 5
Citalopram	147 ± 9	6%	98 ± 6	500 ± 14	3%	100 ± 3
Paroxetina	148 ± 6	4%	99 ± 4	482 ± 13	3%	96 ± 3

A ambos niveles de concentración, los valores de RSD < 10% para NSAIDs y ácido clofíbrico, a excepción del diclofenaco cuyo valor de RSD fue del 11% en los dos niveles de concentración testados, para los SSRI los valores de RSD < 6% obtenidos en los SSRIs en ambos casos.

V.3.4. Aplicación de las metodologías analíticas propuestas en productos de pescado manufacturados

Una vez establecidas las características analíticas de los métodos propuestos, método 1 y método 2, para determinar ibuprofeno, naproxeno, diclofenaco, ácido clofíbrico, cuatro antidepresivos y tres de sus metabolitos, en productos manufacturados derivados del pescado, se procedió a aplicar dichos métodos a diferentes muestras comerciales. Las muestras seleccionadas han sido: ralladura de mar (Pescanova), palitos de mar (Eroski), muslitos de mar (Eroski) y salchichas de mar (Pescanova). Estos productos han sido comprados en supermercados de la localidad de Madrid. Cada muestra se analizó por triplicado según método 1 para determinar el contenido de NSAIDs y ácido clofíbrico y

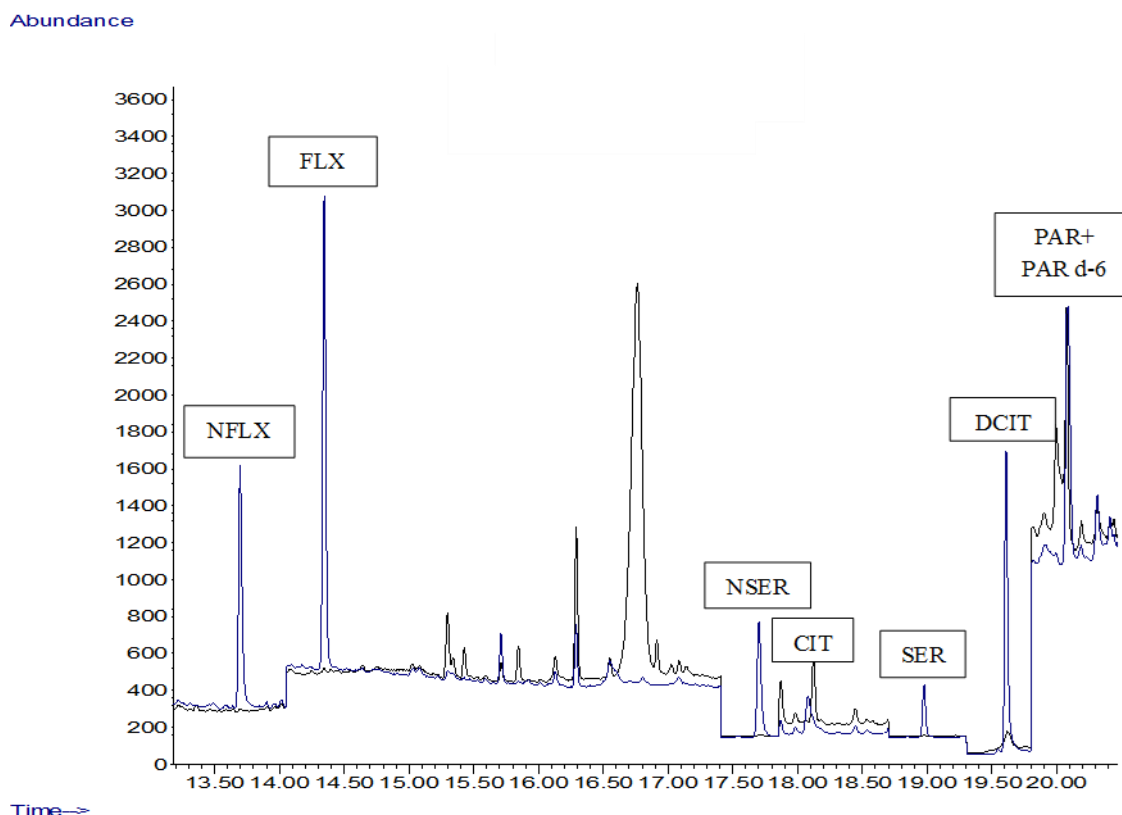
según el método 2 para determinar el contenido de SSRI en este tipo de muestras. La cuantificación de los diferentes analitos, se llevó a cabo mediante calibración por patrón interno en presencia de la matriz. Los resultados obtenidos se muestran en **Tabla V.11**. Los resultados muestran cómo en algún tipo de muestra como ralladura de mar, muslitos de mar y salchichas de mar, se ha detectado residuos farmacéuticos a nivel de trazas en las distintas muestras evaluadas. Esto conlleva a la necesidad de regulación de los fármacos en muestras alimentarias y de desarrollo de metodologías analíticas eficaces que permitan la detección y determinación de fármacos.

Tabla V.11. Concentración media ($\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$) de NSAID, y ácido clofibrico y SSRIs en muestras de productos manufacturados derivados del pescado.

	Ralladura de Mar	Palitos de mar	Muslitos de surimi	Salchichas de mar
Ácido clofibrico	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Ibuprofeno	$36 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Naproxeno	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Diclofenaco	$91 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$	<LOQ	$77 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$	<LOQ
Norfluoxetina	$47 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$	<LOQ	$49 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$	<LOQ
Fluoxetina	$30 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Norsertalina	$22 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$	<LOQ	<LOQ	$23 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$
Citalopram	<LOQ	<LOQ	$361 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$	<LOQ
Sertralina	$40 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Desmetilcitalopram	$33 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$	<LOQ	10	$44 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$
Paroxetina	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ

A modo de ejemplo, en la **Figura V.3**, se incluye una comparativa entre una muestra analizada sin fortificar (color negro) y el cromatograma correspondiente a una muestra de palitos de mar tratada acorde al método 2 fortificada a una concentración de $200 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ de cada antidepresivo y $500 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ de paroxetina- d^6 (color azul) para evaluar y cuantificar la presencia de compuestos antidepresivos en la misma en comparación.

Figura V.3. Cromatogramas comparativa entre una muestra analizada sin fortificar (color negro) y el cromatograma correspondiente a una muestra de palitos de mar tratada acorde al método 2 fortificada a una concentración de $200 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ de cada antidepresivo y $500 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ de paroxetina-d⁶ (color azul).



Para garantizar la salud y bienestar de los animales es completamente necesario el uso de medicamentos veterinarios pero su utilización en animales productores de alimentos puede dejar residuos de los mismos en los productos alimenticios obtenidos a partir de los animales tratados. Dado este problema, con el fin de proteger la salud del consumidor, resulta indispensable evaluar la seguridad de estas sustancias desde el punto de vista del riesgo toxicológico, la contaminación ambiental y los efectos farmacológicos y/o microbiológicos no deseados que pueden producir. Esta evaluación junto a su correspondiente calidad y eficacia, determinará la autorización o no del medicamento correspondiente. Por ello, una sustancia farmacológicamente activa puede usarse en animales productores si se ha evaluado previamente el riesgo/resultado favorable. Además, se establecen valores de LMR para cada sustancia cuando se considera que supone un riesgo para la salud humana. Actualmente, la norma básica que recoge y regula estos LMR es el Reglamento (CE) Nº 470/2009 del Parlamento Europeo y del

Consejo de 6 de Mayo de 2009 por el que se establecen procedimientos comunitarios que fijan los límites de residuos de las sustancias farmacológicamente activas en los alimentos de origen animal, la cual deroga el Reglamento (CEE) Nº 2377/90 del Consejo y se modifican la Directiva 2001/82/CE del Parlamento Europeo y del Consejo y el Reglamento (CE) Nº 726/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo.

En la Unión Europea, el Reglamento (CE) nº 470/2009 sobre procedimientos comunitarios establece la fijación de los límites de residuos de sustancias farmacológicamente activas en los alimentos de origen animal. Este reglamento establece los límites máximos de residuos de sustancias farmacológicamente activas en los alimentos de origen animal, incluyendo carne, pescado, leche, huevos, etc. Con el objetivo de garantizar la seguridad alimentaria.

Dentro de este reglamento se define como límite máximo de residuos (LMR) a la concentración máxima de un residuo de una sustancia farmacológicamente activa que se permite en los alimentos de origen animal. El valor de referencia a efectos de intervención es el nivel de un residuo de una sustancia farmacológicamente activa establecido por motivos de control en el caso de determinadas sustancias para las que no se ha fijado un límite máximo de residuos. Los valores de referencia a efectos de intervención se fijan tras la consulta con laboratorios de control oficiales.

La presencia de residuos a concentraciones superiores al límite máximo de residuos (LMR) legalmente establecido es un clásico en seguridad alimentaria por la amplia utilización de estos compuestos. La causa más frecuente de este incumplimiento suele encontrarse en una mala práctica agrícola, en vertidos incontrolados de las aguas residuales, entre otros, como la aplicación de dosis superiores a las recomendadas o el incumplimiento de los plazos de seguridad. En el caso de los residuos de antiinflamatorios no esteroideos y antidepresivos SSRI, no existen límites máximos establecidos en alimentos procedentes de pescado, pero si están establecidos valores de LMR en carnes y leche procedente de ganado bovino y porcino para diclofenaco (**Tabla V.12.**)¹⁷⁷.

Tabla V.12. Valores de LMR establecidos en carne de ganado bovino y porcino en NSAIDs.

SUSTANCIA FARMACOLÓGICAMENTE ACTIVA	RESIDUO MARCADOR	ESPECIE ANIMAL	LMR	TEJIDOS DIANA	OTRAS DISPOSICIONES ^a
Diclofenaco	Diclofenaco	Bovinos	5 µg/Kg	Músculo	Para los porcinos, el LMR en la grasa está referido a “piel y grasa en proporciones naturales”
			1 µg/Kg	Grasa	
			5 µg/Kg	Hígado	
			10 µg/Kg	Riñón	
			0.1 µg/Kg	Leche	
Diclofenaco	Diclofenaco	Porcinos	5 µg/Kg	Músculo	
			1 µg/Kg	Piel y grasa	
			5 µg/Kg	Hígado	

Con el objetivo de controlar la presencia de residuos farmacéuticos en alimentos, es necesario seguir una serie de guías que permitan establecer barreras de control de seguridad alimentaria para proteger al consumidor. Por ello, resulta vital mejorar y desarrollar métodos de análisis en alimentos que sean cada vez más rápidos y eficaces que permitan llegar a niveles de detección muy bajos, además de ser más conscientes de la problemática existente y facilitar las labores de control.

**Determinación de residuos farmacéuticos en
alimentos y muestras medioambientales.
Evaluación de su toxicidad con larvas de pez
cebra.**

Capítulo VI. Conclusiones

VI. CONCLUSIONES

Las conclusiones derivadas de la presente Tesis Doctoral pueden resumirse en los siguientes puntos:

a) Se han desarrollado diferentes metodologías analíticas miniaturizadas y aplicado con éxito para determinar, mediante CG-MS, los fármacos: ibuprofeno, naproxeno y diclofenaco como antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDs), ácido clofíbrico como regulador lipídico y antidepresivos SSRIs y sus metabolitos como fluoxetina, sertralina, citalopram, paroxetina, norfluoxetina, norsertralina y desmetilcitalopram, en medios acuosos, en huevos de lumpo (sucedáneo de caviar) y en larvas de pez cebra.

b) Las metodologías requieren de una extracción con un disolvente orgánico seguida de una etapa de limpieza mediante SPE. Acetato de etilo se ha seleccionado como extractante más adecuado en el caso de NSAIDs/regulador lipídico y acetonitrilo en el caso de los antidepresivos. El adsorbente C₁₈ resultó ser el óptimo, en ambos casos, para llevar a cabo la etapa de *clean up* mediante extracción en fase sólida.

c) La cuantificación de los diferentes analitos se ha llevado a cabo mediante CG-MS previa derivatización de los mismos, realizando una calibración sobre matriz para evitar el *efecto matriz* y utilizando triclosán como patrón interno en el caso de los antiinflamatorios y paroxetina-deuterada en el caso de los antidepresivos.

d) Los métodos propuestos se han validado en larvas de pez cebra demostrando ser adecuados para su empleo en muestras de muy pequeño tamaño (10-100 mg) y con elevado contenido lipídico (>15%).

e) Los parámetros de calidad, en términos de linealidad, recuperación, precisión y límites de detección/cuantificación, obtenidos para ambos métodos han sido muy satisfactorios.

f) Los métodos analíticos propuestos para determinar los residuos farmacéuticos mediante CG-MS se han aplicado al análisis de una variedad de productos

manufacturados derivados del pescado. Los resultados mostrados en este trabajo presentan un especial atractivo para determinar residuos farmacéuticos en matrices complejas. Los métodos han resultado rápidos, sencillos y sensibles, ya que los LODs y LOQs obtenidos permiten detectar cada analito a niveles muy bajos de concentración en este tipo de muestras. Además, el consumo de disolventes y reactivos y la pequeña cantidad de muestra utilizada (< 100 mg) supone una ventaja importante para desarrollar métodos basados en términos de “química verde”, según se plantea en la literatura más actual. Además, los métodos propuestos no requieren un equipamiento de alto coste.

g) La evaluación del impacto medioambiental de contaminantes emergentes como son los residuos farmacéuticos se ha llevado a cabo empleando larvas de pez cebra, siguiendo la recomendación de la normativa REACH que destaca la conveniencia de reducir el número de pruebas que impliquen el uso de animales y sugiere la necesidad de desarrollar pruebas ecotoxicológicas basadas en enfoques experimentales alternativos como son aquellos que involucran peces en etapas de vida muy tempranas.

h) En este sentido, se ha estudiado el potencial de bioacumulación que tienen las larvas de pez cebra que han crecido expuestas durante 72 horas a los diferentes fármacos adicionados en concentraciones conocidas a los medios de cultivo.

i) Los experimentos de bioacumulación se han seguido a través del cálculo de los factores de bioconcentración, BCFs, determinados a partir de las curvas cinéticas de 1^{er} orden. Los valores de BCFs han sido muy bajos, encontrándose entre 1.1 – 9.3 para los cuatro antiinflamatorios no esteroideos.

j) En el caso de los SSRIs testados, los experimentos de bioacumulación llevados a cabo con los compuestos parentales, fluoxetina, sertralina, citalopram y paroxetina, mostraron valores de bioconcentración bajos para los cuatro analitos, pero se observó una biotransformación de los mismos en sus metabolitos, norfluoxetina, norsertralina y desmetilcitalopram, tras seis horas de exposición. Esto implica que la metabolización de los compuestos parentales en sus metabolitos debe proporcionar una perspectiva

adicional sobre la bioconcentración, así como sobre el perfil toxicológico general de estos compuestos en el medio ambiente acuático.

k) Las metodologías propuestas inicialmente han sido evaluadas y mejoradas para la determinación de las tres familias de fármacos seleccionadas y su aplicación en muestras de tejido de trucha. Ambos métodos propuestos son rápidos, sencillos y sensibles ya que los LODs y LOQs obtenidos permiten detectar cada analito a niveles bajos de concentración en este tipo de muestras. Además, el consumo de solventes y reactivos y la pequeña cantidad de muestra utilizada (100 mg) supone una ventaja importante para desarrollar métodos basados en términos de “química verde”, propuesta en la literatura más actual y permiten analizar muestras alimentarias que permitan establecer una seguridad alimentaria importante y así proteger al consumidor. Además, los métodos propuestos no requieren un equipamiento de alto coste. En ambos casos, cada método tiene una etapa de extracción y limpieza muy sencilla que requiere un tratamiento de muestra mínimo. Esto abre una puerta a la investigación para continuar aplicando y desarrollando métodos analíticos tan necesarios desde el punto de vista de la seguridad alimentaria y seguridad medio ambiental.

l) Ambos métodos reoptimizados y de nueva aplicación en relación al tipo de muestra analizada fueron validados y su eficacia fue investigada. Ambos métodos se aplicaron al análisis de una variedad de productos manufacturados derivados del pescado cuyos resultados mostrando un enfoque esencial, atractivo y prometedor para la determinación de tres familias de fármacos de amplio uso humano y veterinario como los NSAIDs, SSRIs y los reguladores lipídicos lo que supone un avance importante en el desarrollo de métodos analíticos suficientemente sensibles que permitan la determinación de compuestos orgánicos en organismos afectados, como los organismos acuáticos.

**Determinación de residuos farmacéuticos en
alimentos y muestras medioambientales.
Evaluación de su toxicidad con larvas de pez
zebra.**

Capítulo VII. Referencias bibliográficas

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sebastián Sauvé, Mélanie Desrosiers. A review of what is an emerging contaminant. *Chemistry Central Journal* (2014), 8(1):15.
2. Mehrdad Taheran, Mitra Naghdi, Satinder K. Brad, Mausan Verma, R.Y. Surampalli. Emerging contaminants: Here Today, There Tomorrow! *Environmental Nanotechnology, Monitoring and Management* (2018), 10: 122-126.
3. Eleni N. Evgenidou, Ioannis K. Konstantinou, Dimitra A. Lambropoulou. Occurrence and removal of transformation products of PPCPs and illicit drugs in wastewaters: A review. *Science of the Total Environment* (2015), 505: 905-926.
4. John Wilkinson, Peter S. Hooda, James Barker, Stephen Barton, Julian Swinden. Occurrence, fate and transformation of emerging contaminants in water: An overarching review of the field. *Environment Pollution* (2017), 231:954-970.
5. Bruce Petri, Ruth Barden, Barbara Kasprzyk-Hordern. A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: Current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring. *Water Research* (2014), 72:3-27.
6. Beatriz Albero, Consuelo Sánchez-Brunet, Ana I. García-Valcárcel, Rosa A. Pérez, José L. Tadeo. Ultrasound-assisted extraction of emerging contaminants from environmental samples. *Trends in Analytical Chemistry* (2015), 71:110-118.
7. https://www.who.int/water_sanitation_health/emerging/info_sheet_pharmaceuticals/es/
8. Water Framework Directive. Directiva 2000/60/EC, EU, European Parliament and Council, disponible en:
<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32000L0060>
9. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32001D2455>

10. https://fnca.eu/phocadownload/P.CIENTIFICO/inf_contaminacion.pdf
11. Steven D. Melvin. Effect of antidepressants on circadian rhythms in fish: Insights and implications regarding the design of behavioural toxicity tests. *Aquatic Toxicology* (2017), 182: 20-30.
12. Chao Xu, Lili Niu, Haqin Guo, Xiaohui Sun, Lihui Chen, Wenqing Tu, Qizhou Dai, Jing Ye, Weiping Liu, Jinsong Liu. Long-term exposure to the non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) naproxen causes thyroid disruption in zebrafish at environmentally relevant concentrations. *Science of the Total Environment* (2019), 76:387-395.
13. Decisión 2015/495, rectificación de la Directiva 2000/60/EC, EU, Comisión Europea. Watch list of Substances for Union-wide Monitoring. https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=uriserv%3AOJ.L_.2015.078.01.0040.01.ENG.
14. Antonio Delgado Cirilo , Cristina Minguillón Llombart, Jesús Joglar Tamargo Introducción a la Química Terapéutica.. 2ª ed. Ediciones Díaz de Santos, 2003.
15. R. Salgado, A. Oehmen, G. Carvalho, J.P. Noronha, M.A.M. Reis. Biodegradation of clofibric acid and identification of its metabolites. *Journal of Hazardous Materials* (2012), 241-242:182-189.
16. Liping Wang, Jingyun Fang, Xiang Zhang, Xibing Xu, Xiujuan Kong, Zihao Wu, Zhechao Hua, Ziran Ren, Kaiheng Guo. Feasibility of the solar/chlorine treatment for lipid regulator degradation in simulated and real waters: The oxidation chemistry and affecting factors. *Chemosphere* (2019), 226:123-131.
17. Lihong Du, Yang Xu, Donald, G. Musson. Simultaneous determination of clofibrate and its active metabolite clofibric acid in human plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection. *Journal of Chromatography B* (2003), 794:343-351.

18. Benoit Ferrari, Nicklas Paxéus, Roberto Lo Giudice, Antonio Pollio, Jeanne Garric. Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: study of carbamazepine, clofibric acid and diclofenac. *Ecotoxicology and Environmental Safety* (2003), 55:359-370.
19. S.H.Hilal, A.N. Saravanaraj, T.Whiteside, L.A. Carreira. Calculating physical properties of organic compounds for environmental modeling from molecular structure. *Journal of Computes.Aided Molecular Design* (2007), 21(12):693-708.
20. E.M. Malone, G. Dowling, C.T. Elliott, D.G. Kennedy, L. Regan. Development of a rapid, multi-class method for the confirmatory analysis of anti-inflammatory drugs in bovine milk using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* (2009), 1216:8132-8140.
21. Piotr Jedziniak, Teresa Szprengier, Juskiewicz, Konrad Pietruk, Edyta Sledzinska, Jan Zmudzki. Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs and their metabolites in milk by liquid chromatography – tándem mass spectrometry. *Analytical Bioanalytical Chemistry* (2012), 403(10):2955-2963.
22. Comisión Europea, Reglamento 2377/90/EC, Off. J. Eur. Commun. L224 (1990) 1.
23. Idalina Braganca, Alexandra Plácido, Paula Paíga, Valentina F. Domingues, Cristina Delerue-Matos. QuEChERS: A new preparation approach for the determination of ibuprofen and its metabolites in soils. *Science of the Total Environment* (2012), 433: 281-289.
24. European Commission, Proposal for a Directive of the European Parliament and of the Council amending Directives 2000/60/EC as regards priority substances in the field of water policy, in 2011/0429 (COD), Brussels, 2012.

25. Ayman. A. Gouda, Mohamed i. Kotb El-Sayed, Alaa S. Amin, Ragaa El Sheikh. Spectrophotometric and spectrofluorometric methods for the determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs: A review. *Arabian Journal of Chemistry* (2013), 6:145-163.
26. Sarah M.R. Wille, Kristof E. Maudens, Carlos H. Van Peteghem, Willy E.E. Lambert. Development of a solid phase extraction for 13 “newgeneration antidepressants and their active metabolites for gas chromatographic-mass spectrometric analysis. *Journal of Chromatography A* (2005), 1098:19-29.
27. Sarah M. R. Wille, Paul Van Hee, Hugo M. Neels, Carlos H. Van Peteghem, Willy E. Lambert. Comparison of electron and chemical ionization modes by validation a quantitative gas chromatographic-mass spectrometric assay of new generation antidepressants and their active metabolites in plasma. *Journal of Chromatography A* (2007), 1176:236-245.
28. Sara M. R. Wille, Els A. De letter, Michel H. A. Piette, Lien K. Van Overschelde, Carlos H. Van Peteghem, Willy E. Lambert. Determination of antidepressants in human postmortem blood, brain tissue, and hair using gas chromatography-mass spectrometry. *International Journal Legal Medicine* (2009), 123:451-458.
29. André Lajeunesse, Cristian Gagnon, Francois Gagné, Séverine Louis, Patrick Cejka, Sébastien Sauvé. Distribution of antidepressants and their metabolites in brook trout exposed to municipal wastewaters before and after ozone treatment – Evidence of biological effects. *Chemosphere* (2011), 83:564-571.
30. Elisa Pietracchi, Ana-María Bermejo, Iván Álvarez, Pamela Cabarcos, Walter Balduini, María-Jesús Tabernero. Simultaneous determination of new-generation antidepressants in plasma by gas chromatography-mass spectrometry. *Forensic Toxicology* (2013), 31:124-132.

31. Carlos Eduardo Dobrovolskni Porto, Patricia Penido Maia, Daniela Fernanda de Freitas, Rafhaella Carolina Cedro Araújo, Maria Elisa Pereira Bastos de Siquiera, Isarita Martins. Liquid-phase microextraction for simulteneous chromatographic analysis of three antidepressant drugs in plasma. *Quimica Nova* (2012), 35:72-76.
32. Liliana J. G. Silva, André M.P.T. Pereira, Leonor M. Meisel, Celeste M. Lino, Angelina Pena. Reviewing the serotoning reuptake inhibitors (SSRIs) footprint in the aquatic biota: Uptake, bioaccumulation and ecotoxicology. *Environmental Pollution* (2015), 197:127-143.
33. Jenna Coronan, Matthew J. Winter, Charles R. Tyler. Pharmaceuticals in the aquatic environment: A critical review of the evidence for health effects in fish. *Critical Reviews in Toxicology* (2010), 40(4):287-304.
34. Samuel Fekadu, Esayas Alemayehu, Raf Dewil, Bart Van der Bruggen. Pharmaceuticals in freshwater aquatic environments: A comparison of the African and European challenge. *Science of the Total Environment* (2019), 324-337.
35. Chao Xu, Lili Niu, Hangqin Guo, Xiaohui Sun, Jinsong Liu. Long-term exposure to the non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) naproxen causes thyroid disruption in zebrafish at environmentally relevant concentrations. *Science of The Total Environment* (2019), 676:387-395.
36. Zacharias Frontistis. Degradation of the nonsteroidal anti-inflammatory drug piroxicam from environmental matrices with UV-activated persulfate. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* (2019), 378:17-23.
37. T. G. Kebede, S. Dube, M. M. Nindi. Removal of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and carbamazepine from wastewater using water-soluble protein extracted from *Moringa stenopetala* seeds. *Journal of Environmental Chemical Engineering* (2018), 6(2):3095-3103.

38. EC, *White paper-Strategy for a future Chemical Policy*. Off. J. Eur. Union 2001, L 25, 3-7). <http://www.cefic.org>.
39. Agencia europea de seguridad y salud en el trabajo (OSHA): <http://osha.europa.eu/en/sector/construction/@oshtopic-view?tp=/directory/construction/Publication>
40. EC, Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH).
41. <https://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/productos-quimicos/reglamento-reach/default.aspx>.
42. Hengstler, J. G.; Foth, H.; Kahl, R.; Kramer, P. J.; Lilienblum, W.; Schulz, T.; Schweinfurth, H., The REACH concept and its impact on toxicological sciences. *Toxicology* (2006), 220(2-3):232-9.
43. J. Sanz-Landaluze, M. Pena-Abaurrea, R. Muñoz-Olivas, C. Cámara, L. Ramos. Zebrafish (Danio rerio) Eleutheroembryo-Based Procedure for Assessing Bioaccumulation. *Environmental Science & Technology* (2015), 49(3) 1860-1869.
44. Jon A. Arnot, Frank A.P.C. Gobas. A review of bioconcentration factor (BCF) and bioaccumulation factor (BAF) assessments for organic chemicals in aquatic organisms. *Environmental Reviews* (2006), 14(4):257-297.
45. http://agrega.educa.madrid.org/repositorio/06102014/94/esma_2014100612_9105927/2.zip/page_es.html
46. B.I. Escher, A. Baumer, K. Bittermann, L. Henneberger, M. König, C. Kühnert., N. Klüver N. General baseline toxicity QSAR for nonpolar, polar and ionisable chemicals and their mixtures in the bioluminescence inhibition assay with *Aliivibrio fischeri*. *Environmental Science Process Impacts* (2017), 22, 19(3):414-428.

47. Antonio Franco, Andrea Ferranti, Claus Davidsen. An unexpected challenge: ionizable compounds in the REACH chemical space. *The International Journal of Life Cycle Assessment* (2010), 15(4):321-325.
48. A. Springer, H. Herrmann, D. Sittner, U. Herbst, A. Schulte. German Federal Environment Agency (UBA) funded project: REACH Compliance: Data Availability of REACH Registrations, FKZ 3714 67 4200).
49. Kai Bittermann, Simon Spycher, Kai-Uwe Goss. Comparison of different models predicting the phospholipid-membrane water partition coefficients of charged compounds. *Chemosphere* (2016), 144:382-391.
50. European Chemicals Agency (2014) Guidance on Information requirements and chemical safety assessment. Endpoint specific guidance, chapters R.7a. European Chemicals Agency, Helsinki, Finland.
51. Kai Bittermann, Simon Spycher, Satoshi Endo, Larissa Pohler, Uwe Huniar, Kai-Uwe Goss, Andreas Klamt. Prediction of Phospholipid-water partition coefficients of ionic organic chemicals using the mechanistic model COSMOmic. *Journal of Physical Chemistry B* (2014), 118(51):14833-14842.
52. W. Casan Scott, Samuel P. haddad, Gavin N. Saari, C. kevin Chambliss, Jeremy L. Conkle, Cole W. Matson, Bryan W. Brooks. Influence of salinity and pH of bioconcentration of ionizable pharmaceuticals by the gulf killifish, *Fundulus grandis*. *Chemosphere* (2019), 229: 434-442.
53. OECD 2012. Test No. 305: Bioaccumulation in Fish: Aqueous and Dietary Exposure, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 3, O.P., 2012. OECD guidelines for testing of chemicals. Bioaccumulation in Fish: Aqueous and Dietary Exposure doi: 10.1787/2074577x.

54. OECD, 1996. Test no. 305. Bioconcentration: flow-through fish test. In: OECD Series on Testing and Assessment. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD): <http://www.oecdilibrary.org/oecd/content/book/9789264070462-en>
55. FAP. Gobas, X. Zhang. Measuring bioconcentration factors and the rate constants of chemicals in aquatic organisms under conditions of variable water concentrations and short exposure time. *Chemosphere* (1992), 25:1961–1971.
56. A. Spacie, A. J.L. Hamelink. Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. *Environmental Toxicology Chemistry* (1982), 1:11.
57. Banerjee, S.; Sugatt, R. H.; O'Grady, D. P., A simple method for determining bioconcentration parameters of hydrophobic compounds. *Environmental Science Technology* (1984), 18(2):79-81.
58. P.F. Landrum. Bioavailability and Toxicokinetics of Polycyclic Aromatic-Hydrocarbons Sorbed to Sediments for the Amphipod *Pontoporeia-Hoyi*. *Environmental Science & Technology* (1989), 23(5):588-595.
59. A.V. Weisbrod, J. Sahi, H. Segner, M.O. James, J. Nichols, I. Schultz, S. Erhardt, C. Cowan-Ellsberry, M. Bonnell, B. Hoeger. The state of in vitro science for use in bioaccumulation assessments for fish. *Environmental toxicology and chemistry / SETAC* (2009), 28(1):86-96.
60. O. G. Mekenyan, S. D. Dimitrov, T.S. Pavlov, G. D. Veith. POPs: a QSAR system for developing categories for persistent, bioaccumulative and toxic chemicals and their metabolites. *SAR QSAR. Environmental Research* (2005), 16(1-2):103-33.
61. Lozada G. J. A., Palmeros S. B., Ramírez B. M., Fernández M. El pez cebra: una especie modelo. *Revista de Divulgación Científica y Tecnológica de la Universidad Veracruzana*. 2012. Vol: XXV. N°1.

62. Ana López-Serrano Oliver, J. Sanz-Landaluze, R. Muñoz-Olivas, J-Guinea, C. Cámara. Zebrafish larvae as a model for the evaluation of inorganic arsenic and tributyltin bioconcentration. *Water Research* (2011), 45:6515:6524.
63. Barbara D. Fontana, Francini Francescon, Denis B. Rosemberg, William H.J. Norton, Allan V. Kalueff, Matthew O. Parker. Zebrafish models for attention déficit hyperactivity disorder (ADHD). *Neurosciece and Biobehavioral reviews* (2019) 100:9-18.
64. Ronald Y. Kwon, Claire J. Watson, David Karasik. Using zebrafish to study skeletal genomics. *Bone* (2019) 126:37-50.
65. Anton M. Lakstygal, Murilo S. de Abreu, Dmitry Lifanov, Edina A.Wappler-Guzetta, Nazar Serikuly, Erik T. Alpsychoy, DongMei Wang, MengYaoWang, ZhiChong Tang, NiDong Yan, Konstantin A. Demin, Andrey D. Volgin, Tamara G. Amstislavskaya, JiaJia Wang, Cai Song, Polina Alekseeva, Allan V. Kalueff. Zebrafish models of diabetes-related CNS pathogenesis. *Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry* (2018), 8;92:48-58.
66. Stanislav Kislyuk, Jerome Kroonen, Erwin Adams, Patrick Augustijns, Peter de Witte, Deirdre Cabooter. Development of a sensitive and quantitative UHPLC-MS/MS method to study the whole-body uptake of pharmaceuticals in zebrafish. *Talanta* (2017), 174:780-788.
67. C.B. Kimmel, W.W. Ballard, S.R. Kimmel, B. Ullmann, T.F. Schilling. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics* (1995), 203(3):253-310.
68. U. Strahle, S. Scholz, R. Geisler, P. Greiner, H. Hollert, S. Rastegar, A. Schumacher, I. Selderslaghs, C. Weiss, H.T. Witters, T. Braunbeck. Zebrafish embryos as an alternative to animal experiments-A commentary on the definition of the onset of protected life stages in animal welfare regulations. *Reproductive Toxicology* (2011), 33:128-132.

69. Shangbo Zhou, Qiqing Chen, Carolina Di Paolo, Ying Shao, Henner Hollert, Thomas-Benjamin Seiler. Behavioral profile alterations in zebrafish larvae exposed to environmentally relevant concentrations of eight priority pharmaceuticals. *Science of the Total Environment* (2019), 664:89-98.
70. Gunnar Carlsson, Johan Patring, Jenny Kreuger, Leif Norrgren, Agneta Oskarsson. Toxicity of 15 veterinary pharmaceuticals in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Aquatic Toxicology* (2013), 126:30-41.
71. Irvin J. Huang, Howard I. Sirotkin, Anne E. McElroy. Varying the exposure period and duration of neuroactive pharmaceuticals and their metabolites modulates effects on the visual motor response in zebrafish (*Danio rerio*) larvae. *Neurotoxicology and Teratology* (2019), 72:39-48.
72. Gunnar Carlsson, Maria Blomberg, Johannes Pohl, Stefan Orn. Swimming activity in zebrafish larvae exposed to veterinary antiparasitic pharmaceuticals. *Environmental toxicology and pharmacology* (2018), 63:74-77.
73. OECD Guidelines for the testing of chemicals. 26 July 2013. <https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264203709->.
74. EURL ECVAM Recommendation on the Zebrafish Embryo Acute Toxicity Test Method (ZFET) for Acute Aquatic Toxicity Testing M.E. Halder, C. Griesinger, S.P. Amcoff, V. Zuang, M. Whelan. EUR - Scientific and Technical Research Reports Publications Office of the European Union ISBN: 978-92-79-38937-5. 201.
75. K. Schirmer, K. Tanneberger, N. Kramer, D. Volker, S. Scholz, C. Hafner, L.E. Lee, N.C. Bols, J.L. Hermens. Developing a list of reference chemicals for testing alternatives to whole fish toxicity tests. *Aquatic Toxicology* (2008), 90(2):128-37.

76. R. Gonzalo-Lumbreras, J. Sanz-Landaluze, J. Guinea, C. Cámara. Miniaturized extraction methods of triclosan from aqueous and fish roe samples. Bioconcentration studies in zebrafish larvae (*Danio rerio*). *Anal Bioanal Chem* (2012), 403:927-937.
77. S. El-Amrani, J.Sanz-Landaluze, J.Guinea, C.Cámara. Rapid determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in zebrafish eleutheroembryos as a model for the evaluation of PAH bioconcentration. *Talanta* (2013), 104:67-74.
78. S. El-Amrani, M. Pena-Abaurrea J.Sanz-Landaluze, L. Ramos, J.Guinea, C.Cámara. Bioconcentration of pesticides in Zebrafish eleutheroembryos (*Danio rerio*). *Science of the Total Environment* (2012), 425:184–190.
79. A. López-Serrano Oliver, J. Sanz-Landaluze, R. Muñoz-Olivas, J-Guinea, C. Cámara. Zebrafish larvae as a model for the evaluation of inorganic arsenic and tributyltin bioconcentration. *Water Research* (2011), 45:6515:6524.
80. S. Cuello, J. Sanz-Landaluze, Y. Madrid, J. Guinea, C. Cámara. Bioaccumulation and transformation of methylmercury and selenite using zebrafish (*Danio Rerio*) larvae as a model. *Talanta* (2012), 89:169-177.
81. A. López-Serrano, R. Muñoz-Olivas, J. Sanz-Landaluze, M. Olasagasti, S. Rainieri, C. Cámara. Comparison of bioconcentration of ionic silver and silver nanoparticles in zebrafish eleutheroembryos. *Environmetal Pollution* (2014), 191:207-214.
82. S. Zarco-Fernández, AM. Coto-García, R. Muñoz-Olivas, J. Sanz Landaluze, S. Rainieri, C. Cámara. Bioconcentration of ionic cadmium and cadmium selenide quantum dots in zebrafish larvae. *Chemosphere* (2016), 148:328-335.
83. Ana López-Serrano Oliver, Riansares Muñoz-Olivas, Jon Sanz Landaluze, Sandra Rainieri, Carmen Cámara. Bioaccumulation of ionic titanium and titanium dioxide nanoparticles in zebrafish eleutheroembryos. *Nanotoxicology* (2015), 9(7):835-842.

84. Daniel Wolecki, Magda Caban, Ksenia Pazdro, Ewa Mulkiwicz, Piotr Stepnowski, Jolanta Kumirska. Simultaneous determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs and natural estrogens in the mussels *Mytilus edulis trossulus*. *Talanta* (2019), 200:316-323.
85. Soyoung Shin, Hyeon Myeong Jeong, Seung Eun Chung, Tae Hwan Kim, Subindra Kazi Thapa, Da Young Lee, Chang Ho Song, Jun Young Lim, Sang-Min Cho, Kyu-Yeol Nam, Won-Ho Kang, Youn-Woong Choi, Beom Soo Shin. Simultaneous analysis of acetylcarnitine, proline, hydroxiprolin, citrullin and arginin as potential plasma biomarkers to evaluate NSAIDs-induced gastric injury by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (2019), 165:101-111.
86. Emmanuel Oluwasegun Adawaren, Lilian Mukandiwa, Emmanuel Mfotie Njoya, Lizette Bekker, Neil Duncan, Vinny Naidoo. The use of liver slices from the Cape vulture (*Gyps coprotheres*) to better understand the role of liver toxicity of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in vultures. *Environmental Toxicology and Pharmacology* (2018), 62: 147-155.
87. Malek Hassan, Usama Alshana. Switchable-hydrophilicity solvent liquid-liquid microextraction of non-steroidal anti-inflammatory drugs from biological fluids prior to HPLC-DAD determination. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (2019), 174:509-517.
88. Maristela B.R. Cerqueira, Sergiane S. Caldas, Ednei G. Primel. New sorbent in the dispersive solid phase extraction step of quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe for the extraction of organic contaminants in drinking water treatment sludge. *Journal of Chromatography A* (2014), 1336:10–22.
89. Mohammad Saraji, Malihe Khalili Boroujeni. Recent developments in dispersive liquid–liquid microextraction. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (2014), 406:2027–2066;

90. Carla Toledo-Neira, Alejandro Álvarez-Lueje. Ionic liquids for improving the extraction of NSAIDs in water samples using dispersive liquid–liquid microextraction by high performance liquid chromatography–diode array–fluorescence detection. *Talanta* (2015), 134:619–626.
91. Dandan Han, Kyung Ho Row. Recent Applications of Ionic Liquids in Separation Technology. *Molecules* (2010), 15:2405-2426.
92. Tomasz Tuzimski, Tomasz Rejczak. Comparison of SPE/d-SPE and QuEChERS-Based Extraction Procedures in Terms of Fungicide Residue Analysis in Wine Samples by HPLC-DAD and LC-QaQ-MS. *Journal of AOAC International* (2016), 99(6):1436-1443.
93. Ariel R. Fontana, Alejandra Carmargo, Luis D. Martínez, Jorgelina C. Altamirano. Dispersive solid-phase extraction as a simplified clean-up technique for biological simple extracts. Determination of polybrominated diphenyl ethers by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* (2011), 1218:2490-2496.
94. Gabriela Islas, Israel S. Ibarra, Prisciliano Hernández, Jose M. Miranda, Alberto Cepeda. Dispersive Solid Phase Extraction for the Analysis of Veterinary Drugs Applied to Food Samples: A Review. *International Journal of Analytical Chemistry* (2017), 1-16.
95. María J. Trujillo-Rodríguez, Priscilla Rocío-Bautista, Verónica Pino, Ana M. Afonso. Ionic liquids in dispersive liquid-liquid microextraction (2013), 51:87-106.
96. GW. Meindersma, AJG Podt, AB de Haan. Selection of ionic liquids for the extraction of aromatic hydrocarbons from aromatic/aliphatic mixture. *Fuel Processing Technology* (2005), 87(1):59-70
97. Baokun Tang, Wentao Bi, Minglei Tian, Kyung Ho Row. Application of ionic liquid for extraction and separation of bioactive compounds from plants. *Journal of Chromatography B* (2012), 904:1-21.

98. Sheying Dong, Qing Hu, Zhen Yang, Rong Liu, Guiqi Huang, Tinglin Huang. An ionic liquid-based ultrasound assisted dispersive liquid-liquid microextraction procedure followed by HPLC for the determination of low concentration of phytocides in soil. *Microchemical Journal* (2013), 110:221-226.
99. J. Schwaigera, H. Ferlinga, U. Mallow. Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac. Part I: histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout. *Aquatic Toxicology* (2004), 68:141–150.
100. F. Sacher, F.T. Lange, H.-J. Brauch, I. Blankenhorn. Pharmaceuticals in groundwaters. Analytical methods and results of a monitoring program in Baden-Württemberg, Germany, *Journal of Chromatography A* (2001), 938: 199–210.
101. J.-Y. Pailier, K.L. Pfister, L. Hoffmann, C. Guignard. Solid phase extraction coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of sulfonamides, tetracyclines, analgesics and hormones in surface water and wastewater in Luxembourg, *Science and Total Environmental* (2009), 407: 4736-4743.
102. Fangfang Chen, Zhiyuan Gong, Barry C. Kelly. Rapid analysis of pharmaceuticals and personal care products in fish plasma microaliquots using liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A* (2015), 1383:104–111.
103. V. Contardo-Jaraa, C. Lorenza. S. Pflugmacher. Exposure to human pharmaceuticals Carbamazepine, Ibuprofen and Bezafibrate causes molecular effects in *Dreissena polymorpha*. *Aquatic Toxicology* (2011), 105:428–437.
104. S. Weigel, R. Kallenborn, H. Hühnerfuss, Simultaneous solid-phase extraction of acidic, neutral and basic pharmaceuticals from aqueous samples at ambient (neutral) pH and their determination by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* (2004), 1023:183–195.

105. M.J. Gómez, M. Petrovic, A.R. Fernández-Alba, D. Barceló, Determination of pharmaceuticals of various therapeutic classes by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis in hospital effluent wastewaters, *J. Chromatography A* (2006), 1114:224–233.
106. J.-L. Zhao, G.-G. Ying, L. Wang, J.-F. Yang, X.-B. Yang, L.-H. Yang, X. Li, Determination of phenolic endocrine disrupting chemicals and acidic pharmaceuticals in surface water of the Pearl Rivers in South China by gas chromatography-negative chemical ionization-mass spectrometry. *Science and Total Environmental* (2009), 407:962–974.
107. M. Cleuvers. Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicol. Lett.* (2003), 142:185–194.
108. Marta Cruz-Vera, Rafael Lucena, Soledad Cárdenas, Miguel Valcárcel, One-step in-syringe ionic liquid-based dispersive liquid–liquid microextraction, *Journal of Chromatography A* (2009), 1216:6459–6465.
109. Yu Ji, Zhenxia Du, Haojie Zhang and Yun Zhang. Rapid analysis of non-steroidal anti-inflammatory drugs in tap water and drinks by ionic liquid dispersive liquid–liquid microextraction coupled to ultra-high performance supercritical fluid chromatography. *Anal. Methods* (2014), 6:7294:7304.
110. M.J.M. Bueno, A. Agüera, M.D. Hernando, M.J. Gómez, A.R. Fernández-Alba, Evaluation of various liquid chromatography-quadrupole-linear ion trap mass spectrometry operation modes applied to the analysis of organic pollutants in wastewaters, *Journal of Chromatography A* (2009), 1216:5995–6002.
111. R. Triebskorn, H. Casper, V. Scheil, J. Schwaiger, Ultrastructural effects of pharmaceuticals (carbamazepine, clofibric acid, metoprolol, diclofenac) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and common carp (*Cyprinus carpio*), *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (2007), 387:1405–1416.

112. James P. Meador, Andrew Yeh, Evan P. Gallagher. Determining potential adverse effects in marine fish exposed to pharmaceuticals and personal care products with the fish plasma model and whole-body tissue concentrations. *Environmental Pollution* (2017), 230:1018.
113. Arthur David, Anke Lange, Charles R. Tyler, Elizabeth M. Hill. Concentrating mixtures of neuroactive pharmaceuticals and altered neurotransmitter levels in the brain of fish exposed to a wastewater effluent. *Science of the Total Environment* (2018), 782:790.
114. M. M. Schultz and E. T. Furlong. Trace Analysis of Antidepressant Pharmaceuticals and Their Select Degradates in Aquatic Matrixes by LC/ESI/MS/MS. *Analytical Chemistry* (2008), 80:1756-1762.
115. Liliana J. G. Silva, André M. P. T. Pereira, Helena Rodrigues, Leonor M. Meisel, Celeste M. Lino, Angelina Pena. SSRIs antidepressants in marine mussels from Atlantic coastal areas and human risk assessment. *Science of The Total Environment* (2017), 603-604:118-125.
116. Etienne Weisskopf, Alice Panchaud, Kim An Nguyen, Delphine Grosjean, Jean-Michel Hascoet, Chantal Csajka, Chin B. Eap, Nicolas Ansermot. Simultaneous determination of selective serotonin reuptake inhibitors and their main metabolites in human breast milk by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* (2017), 1057: 101-109.
117. Alaa Khraiwesh, Ioannis Papoutsis, Panagiota Nikolaou, Constantinos Pistos, Chara Spiliopoulou, Sotirios Athanaselis. Development and validation of an EI-GC/MS method for the determination of sertraline and its major metabolite desmethyl-sertraline in blood. *Journal of Chromatography B* (2011), 279:2576-2582.
118. Shaogang Chu, Chris D. Metcalfe. Analysis of paroxetine, fluoxetine and norfluoxetine in fish tissues using pressurized liquid extraction, mixed mode solid phase

extraction cleanup and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* (2007), 1-2:112-118.

119. Siming Huang, Fang Zhu, Ruifen Jiang, Shichun Zhou, Derong Zhu, Hong Liu, Gangfeng Ouyang. Determination of eight pharmaceuticals in an aqueous sample using automated derivatization solid-phase microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry. *Talanta* (2015), 136: 198-203.

120. Sarah Montesdeoca-Esponda, Cristina Mahugo-Santana, Zoraida Sosa-Ferrera, José Juan Santana-Rodríguez. A dispersive liquid-liquid micellar microextraction for the determination of pharmaceutical compounds in wastewaters using ultra-high-performance liquid chromatography with DAD detection. *Biomedical Chromatography* (2014), 29(3):353-356.

121. Páleníková A, Martínez-Dominguez G., Arrebola FJ., Romero-González R., Hrouzková S., Frenich AG. Multifamily determination of pesticide residues in soya-based nutraceutical products by GC/MS-MS. *Food Chemistry* (2015), 173:796-807.

122. Jenna Corcoran, Matthew J. Winter, Charles R. Tyler. Pharmaceuticals in the aquatic environment: A critical review of the evidence for health effects in fish. *Critical Reviews in Toxicology* (2010), 40(4): 287-304.

123. ISO, Water quality -- Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)] -- Part 1: Static method. In ISO 7346-1:1996, Standardization, I. O. f., Ed. 1996.

124. Westerfield MA (2007) *Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Danio Rerio)*, 5th Edition. University of Oregon Press, Eugene, USA.
<http://zebrafish.org/zirc/home/guide.php>.

125. B.Nunes, F. Carvalho, L.Guilhermino. Acute toxicity of widely used pharmaceuticals in aquatic species: *Gambusia holbrooki*, *Artemia parthenogenetica* and *Tetraselis chuii*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* (2005), 61:413-419.
126. E. Praskova, Z. Siroka, L. Plhalova, S. Macova, P. Marsalek, V. Pistekova, Z. Svobodova. Assesment of diclofenac LC50 reference values in juvenile and embryonic stages of the zebrafish (*Danio rerio*). *Polish Journal of Veterinary Sciences*(2011), 14(4): 545-549.
127. Jian Li, Li Xu, Zhi-guo Shi, Min Hu. A novel two-dimensional liquid chromatographic system for the online toxicity prediction of pharmaceuticals and related substances. *Journal of Hazardous Materials* (2015), 293:15-20.
128. Jian Xu, Laosheng Wu, Wieping Chen, Andrew C. Chang. Simultaneous determination of pharmaceuticals, endocrine disrupting compounds and hormone in soils by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* (2008) 1202: 189-195.
129. Young Yu, Laosheng Wu. Comparison of four extraction methods for the analysis of pharmaceuticals in wastewater. *Journal of Chromatography A* (2011) 1218: 2483-2489.
130. Young Yu, Laosheng Wu. Analysis of endocrine disrupting compounds, pharmaceuticals and personal care products in sewage sludge by gas chromatography-mass spectrometry. *Talanta* (2012) 89:258-263.
131. Zuhre Senturk, Cafer Saka, Ibrahim Tegin. Analytical methods for determination of selective serotonin reuptake inhibitor antidepressants. *Reviews in Analytical Chemistry* (2011), 30(2).
132. Abdelmonaim Azzouz, Badreline Souhail, Evaristo Ballesteros. Continuous solid-phase extraction and gas chromatography –mass spectrometry determination of pharmaceuticals and hormones in water samples. *Journal of Chromatography A* (2010), 1217:2956–2963.

133. C. Schummer, O. Delhomme, M.R. Appenzeller. Comparision of MTBSTFA and BSTFA in derivatization reactions of polar compounds prior to GC/MS analysis. *Talanta* (2009), 77:1473-1482.
134. A.M. Casas Ferreira, M.E. Fernández Laespada, J.L. Pérez Pavón. In situ aqueous derivatization as sample preparation technique for gas chromatographic determinations. *Journal of Chromatography A* (2013), 1296:70-83.
135. Antonia M. Carro, Paula González, Rosa A. Lorenzo. Applications of derivatization reactions to trace organic compounds during sample preparation based on pressurized liquid extraction. *Journal of Chromatography A* (2013), 1296:214– 225.
136. Sun-Young Park, Bo-Xin Kang, Quing-Li, Hoon Sik Kim, J. Lee and J.Hong. Chemical Derivatization of Catecholamines for Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Korean Chemistry Society* (2009), 30:1497-1505.
137. N. Danielson, P. A. Gallagher, and J. J. Bao. Chemical Reagents and Derivatization Procedures in Drug Analysis. *Encyclopedia of Analytical Chemistry* (2010).
138. H.H. Lee, J. F. Lee, S. Yu Lin, P. Ho Chen, B. H. Chen. Simultaneous determination of HFBA-derivatized amphetamines and ketamines in urine by Gas Chromatography-Mass Spectrometry (2011), 35:162-169.
139. A.F. Felicioni, E. Costa, A.J. dos Santos. Analysis of fluoxetine and norfluoxetine in human plasma by liquid phase microextraction and injection port derivatization GC-MS. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* (2013), 73:53-58.
140. A.E. Pierce. Silylation of organic compounds: a technique for gas phase analysis. Chemical Co. 1968.

141. Bikram Subedi, Mohammad A. Mottaleb, C. Kevin Chambliss, Sascha Usenko. Simultaneous analysis of select pharmaceuticals and personal care products in fish tissue using pressurized liquid extraction combined with silica gel cleanup. *Journal of Chromatography A* (2011), 1218:6278-6284.
142. Alessandra Gentili, Fulvia Caretti, Simona Bellante, Lucía Mainero Rocca, Roberta Curini, Alessandro Venditti. Development and validation of two multiresidue liquid chromatography tandem mass spectrometry methods based on a versatile extraction procedure for isolating non-steroidal anti-inflammatory drugs from bovine milk and muscle tissue. *Analytical Bioanalytical Chemistry* (2012), 404:1375-1388.
143. R. Gonzalo-Lumbreras, J. Sanz-Landaluze, C. Cámara. Analytical performance of two miniaturised extraction methods for triclosan and methyltriclosan, in fish roe and surimi samples. *Food Chemistry* (2014), 146:141-148.
144. M.A.Sousa, C. Goncalves, E. Cunha, J.Hajslová. Cleanup strategies and advantages in the determination of several therapeutic clases of pharmaceuticals. Cleanup strategies and advantages in the determination of several therapetuic clases of pharmaceuticals in wastewater samples by SPE-LC-MS/MS. *Analytical Bioanalytical Chemistry* (2011), 399:807-822.
145. B. Huerta, A. Jakimska, M. Gros, S. Rodríguez-Mozaz, D. Barceló. Analysis of multi-class pharmaceuticals in fish tissues by ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* (2013), 1288:63-72.
146. Carlos Guitart, James W. Readman. Critical evaluation of the determination of pharmaceuticals, personal care products, phenolic endocrine disrupters and faecal steroids by GC/MS and PTV-GC/MS. *Analytical Chimica Acta* (2010), 658:32-40.
147. Victor Matamoros, Diana Calderón-Preciado, Carmen Domínguez, Josep M. Bayona. Anytical procedures for the determination of emerging contaminants in plant material: A review. *Analytica Chimica Acta* (2012), 722:8-20.

148. Jon A. Arnot, Don Mackay, Thomas F. Parkerton, Mark Bonnel. A database of fish biotransformation rates for organic chemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry* (2008), 27(11):2263-2270.
149. Jeffrey N. Brown, Nicklas Paxeus, Lars Forlin, D.G. Joakim Larsson. Variations in bioconcentration of human pharmaceuticals from sewage effluents into fish blood plasma. *Environmental Toxicology and Pharmacology* (2007), 24:267-274.
150. Gopinath C. Nallani, Peter M. Paulos, Lisa A. Constantine, Barney J. Venables, Duane B. Huggett. Bioconcentration of ibuprofen in fathead minnow (*Pimephales promelas*) and channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Chemosphere* (2011), 84: 1371-1377.
151. Jenny-Maria Brozinski, Marja Lahti, Axel Meierjohann, Aimo Oikari, Leif Kronberg. The anti-inflammatory drugs Diclofenac, Naproxen and Ibuprofen are found in the Bile of Wild Fish Caught Downstream of a Wastewater Treatment Plant. *Environmental Science&Technology* (2013), 47(1), 342-348.
152. J. Schewaiger, H. Ferling, U. Mallow, H. Wintermayr, R.D. Negele. Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac. Part I: histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout (2004), 68:141-150.
153. Jian Wang, Piero R. Gardinali. Uptake and depuration of pharmaceuticals in reclaimed water by mosquito fish (*Gambusia Holbrooki*): A worst-case, multiple-exposure scenario. *Environmental Toxicology and Chemistry* (2013), 32(8) 1752-1758.
154. Rumi Tanoue, Kei Nomiya, Haruna Nakamura, Terutake Hayashi, Joon-Woo Kim, Tomohiko Isobe, Ryota Shinohara, Shinsuke Tanabe. Simultaneous determination of polar pharmaceuticals and personal care products in biological organs and tissues. *Journal of Chromatography A* (2014), 1355:193-205.

155. Marja Lahti, Jenny-Maria Brozinski, Antti Jylha, Leif Kronberg, Aimo Oikari. Uptake from water, biotransformation, and biliary excretion of pharmaceuticals by rainbow trout (2011), 30(6):1403-1411.
156. Russell J. Erickson, James M. McKim, Gregory J. Llen, Alex D. Hoffman, Sharon L. Batterman. Uptake and elimination of ionizable organic chemicals at fish gills: I. Model formulation, parameterization and behavior. *Environmental and Chemistry* (2006), 25(6) 1512:1521.
157. Sheyla Ortiz de García, Gilberto Pinto Pinto, Pedro A. García-Encina, Rubén Irusta Mata. Ranking of concern, based on environmental indexes, for pharmaceutical and personal care products: An application to the Spanish case. *Journal of Environmental Management* (2013), 129:384-397.
158. Vania Calisto, Valdemar I. Esteves. Psychiatric pharmaceuticals in the environment. *Chemosphere* (2009), 77: 1257-1274.
159. Hans Sanderson, Marianne Thomsen. Comparative analysis of pharmaceuticals versus industrial chemicals acute aquatic toxicity classification according to the United Nations classification system for chemicals. Assessment of the (Q)SAR predictability of pharmaceuticals acute aquatic toxicity and their predominant acute toxic mode-of-action. *Toxicity Letters* (2009), 187:84-93.
160. Sara C. Monteiro, Ailtair B. A. Boxall. Occurrence and fate of human pharmaceuticals in the environment. Review. *Environmental of Environmental Contamination and Toxicology* (2010), 202:53-154.
161. Ioannis Papoutsis, Alaa Khraiweh, Panagiota Nikolaou, Constantinos Pisos, Chara Spiliopoulou, Sotirios Athanaselis. A fully validated method for the simultaneous determination of 11 antidepressant drugs in whole blood by gas chromatography-mass spectrometry (2012), 70:557-562.

162. D.G. Joakim Larsson, Cecilia de Pedro, Nicklas Paxeus. Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals. *Journal of Hazardous Materials* (2007), 148. 751-755.
163. Xiujuan Chen, Shuiqing Zheng, Jian Le, Zheyuan Qian, Runsheng Zhang, Zhanying Hong, Yifeng Chai. Ultrasound-assisted low-density solvent dispersive liquid-liquid microextraction for the simultaneous determination of 12 new antidepressants and 2 antipsychotics in whole blood by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (2017), 142:19-27.
164. Liliana J. G. Silva, Margarida C. Martins, André M.P.T. Pereira, Leonor M. Meisel, María Gonzalez-Rey, maria João Bebianno, Celeste M. Lino, Angelina Pena. Uptake, accumulation and metabolization of the antidepressant fluoxetine by *Mytilus galloprovincialis*. *Environmental Pollution* (2016), 213:432-437.
165. Gordon Paterson, Chris D. Metcalfe. Uptake and depuration of the anti-depressant fluoxetine by the Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Chemosphere* (2008), 74:125-130.
166. Theodore W. Valenti, Jr., Gerogianna G. Gould, Jason P. Berninger, Kristin A. Connors, N. Bradley Keele, Krista N. Prosser, Bryan W. Brooks. Human Therapeutic Plasma Levels of the Selective Serotonin Reuptake Inhibitor (SSRI) Sertraline Decrease Serotonin Reuptake Transporter Binding and Shelter-Seeking Behavior in Adult Male Gizzard Shad. *Environmental Science & Technology* (2012), 46(4): 2427-2435.
167. Kristin A. Connors, Bowen Du, Patrick N. Fitzsimmons, Alex D. Hoffman, C. Kevin Chambliss, John W. Nichols, Bryan W. Brooks. Comparative pharmaceutical metabolism by rainbow trout (*Oncorhynchus Mykiss*) liver S) fractions. *Environmental Toxicology and Chemistry* (2013), 32(8) 1810-1818.
168. Liliana J.G. Silva, Celeste M. Lino, Leonor M. Meisel, Angelina Pena. Selective serotonin re-uptake inhibitors (SSRIs) in the aquatic environment: An ecopharmacovigilance approach. *Science of the Total Environment* (2012), 437:185-195.

169. C.F. Gomez, L. Constantine, D.B. Huggett. The influence of gill and liver metabolism on the predicted bioconcentration of three pharmaceuticals in fish. *Chemosphere* (2010), 81: 1189-1195.
170. Emily M. Smith, Shaogang Chu, Gordon Paterson, Chris D. Metcalfe, Joana Y. Wilson. Cross-species comparison of fluoxetine metabolism with fish liver microsomes. *Chemosphere* (2010), 79: 26-32.
171. C.F. Gomez, L. Constantine, M. Moen, A.Vaz, W. Wang, Duane B. Hugget. Ibuprofen Metabolism in the Liver and Gill of Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Bull Environmental Contamination and Toxicology* (2011), 86(3): 247-251.
172. Yuki Nakamura, Hiroshi Yamamoto, Jun Sekizawa, Takuya Kondo, Narisato hirai, Norihisa Tatarazako. The effects of pH on fluoxetine in Japanese medaka (*Oryzias latipes*): Acute toxicity in fish larvae and bioaccumulation in juvenile fish. *Chemosphere* (2008), 70: 865-873.
173. Erik Skjelbo, Kim Brosen. Inhibitors of imipramine metabolism by human liver microsomes. *British Journal of Clinical Pharmacology* (1992), 34(3): 256-261.
174. Marie Katrine Klose Nielsen, Sys Stybe Johansen, Petur Weihe Dalsgaard, Kristian Linnet. Simultaneous screening and quantification of 52 common pharmaceuticals and drugs of abuse in hair using UPLC-TOF-MS. *Forensic Science International* (2010), 196:85-92.
175. Abdelmonaim Azzouz, Badredine Souhail, Evaristo Ballesteros. Determination of residual pharmaceuticals in edible animal tissues by continuous solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Talanta* (2010), 84:820-828.
176. Franziska Kumbriegel, Martin Hastedt, Susann Eichberg, Nora Correns, René Gapert, Sven Hartwig, Sieglinde Herre, Michael Tsokos. Hair analysis in the detection of long-term use of non-steroidal anti-inflammatory drugs and its relation to gastrointestinal

hemorrhage: an examination of 268 hair and blood samples from autopsy cases. *Forensic Science, Medicine and Pathology* (2014), 10(1):18-28.

177. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32010R0037&qid=1562276008978&from=en>.

178. Boletín terapéutico andaluz. Monografías: Medicamentos y lactancia. Año 2001, nº19.

179. <http://www.codexalimentarius.net/pestres/data/commodities/details.html?id=187>.

180. Geraldine Dowling, Pasquale Gallo, Edward Malone, Liam Regan. Rapid confirmatory analysis of non-steroidal anti-inflammatory drugs in bovine milk by rapid resolution liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* (2009), 1216, 8117-8131.

181. Nurlin Abu Samah, María-Jesús Sánchez-Martín, Rosa M. Sebastián, Manuel Valiente, Montserrat López-Mesas. Molecularly imprinted polymer for the removal of diclofenac from water: Synthesis and characterization. *Science of the Total Environment* (2018), 631-632: 1534-1543.

182. Kaori Hoshina, Shizuyo Horiyama, Hisami Matsunaga, Jun Haginaka. Simultaneous determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in river water samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using molecularly imprinted polymers as a pretreatment column. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (2011), 55:916-92.

183. M.V. Polyakov. Adsorption properties and structure of silica gel. *Zhurnal fizicheskoi khimii* 2 S. (1931), 799-804.

184. G. Wulff, G. A. Sarhan. The use of polymers with enzyme-analogous structures for the resolution of racemates. *Angew. Chemistry International* (1972), 11:341-344.

185. T. Takagishi, I.M. Klotz, *Biopolymers*, 1972, 11, 483.
186. L.I. Andersson, B. Sellergren, K. Mosbach, *Tetrahedron Letters* (1984), 25, 5211.
187. Chiyang He, Yuanyuan Long, Junlan Pan, Kean Li, Feng Liu. Application of molecularly imprinted polymers to solid-phase extraction of analytes from real samples. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* (2007), 70(2): 133-150.
188. Valérie Pichon & Karsten Haupt. Affinity separations on Molecularly Imprinted Polymers with Special Emphasis on Solid-Phase Extraction. *Journal of Liquid Chromatography&Related Technologis* (2007), 29(7-8), 989-1023.
189. E. Caro, R. M. Marcé, F. Borrull, P.A.G. Cormack, D.C.Sherrington. Application of molecularly imprinted polymers to solid-phase extraction of compounds from environmental and biological samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* (2006), 25(2); 143-154.
190. Piletsky S.A. Turner A.P.F. Electrochemical sensors based on molecularly imprinted polymers. *Electroanalysis* (2002), 14:317-323.
191. Hilberg A.L. Brain K. R., Allender C.J. Molecular imprinted polymer sensors: implications for therapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews* (2005), 57: 1875-1889.
192. Mizuki Tada, Yasuhiro Iwasawa. Chemical design and in situ characterization of active surface selective catalysis. *Annual Review of Materials Research* (2005), 35:397-426.
193. Alexander, C., L. Davidson, W. Hayes. Imprinted polymers: artificil molecular recognition materials with applications in systhesis and catalysis. *Tetrahedron* (2003), 59:2025-2057.

194. Haruyuki Hiratani, Yuri Mizutani, Carmen Alvarez-Lorenzo. Controlling Drug Release from Imprinted Hydrogels by Modifying the Characteristics of the Imprinted Cavities. *Macromolecular Bioscience* (2005), 5(8): 728-733.
195. B. Sellergren, *Molecularly Imprinted Polymers: Man-Made Mimics of Antibodies and their Application in Analytical Chemistry*, Elsevier, Amsterdam (2001), Capítulo 5.
196. F. Lanza, A.J. Hall, B. Sellergren, A. Bereczki, G. Horvai, S. Bayoudh, P.A.G. Cormack, D.C. Sherrington. Development of a semiautomated procedure for the synthesis and evaluation of molecularly imprinted polymers applied to the search for functional monomers for phenytoin and nifedipine. *Analytica Chimica Acta* (2001), 435:91-106.
197. A.G. Mayes, M.J. Whitcombe. Synthetic strategies for the generation of molecularly imprinted organic polymers. *Advanced Drug Delivery Reviews* (2005), 57(12): 1742-1778.
198. Xianwen Kan, Qun Zhao, Zhong Zhang, Zhilin Wang, Jun-Jie Zhue. Molecularly imprinted polymers microsphere prepared by precipitation polymerization for hydroquinone recognition. *Talanta* (2008), 75:22-26.
199. E. Turiel, Esteban A. Martín. Molecular imprinting technology in capillary electrochromatography. *Journal of Separation Science* (2005), 28(8):719-728].
200. Sobhi Daniel, P. Prabhakara Rao, T. Prasada Rao. Investigation of Different Polymerization Methods on the Analytical Performance of Palladium (II) Ion Imprinted Polymer Materials. *Analytica Chimica Acta* (2005), 536:197-206.
201. Hong, S., Albu, R., Labbe, C., Lasuye, T., Stasik, B. Riess, G. Preparation and characterization of colloidal dispersions of vinyl alcohol – vinylacetate copolymers: applications as stabilizers for vinyl chloride suspension polymerization. *Polymer International* (2006), 55:1426-1434.

202. Tina Erdmenger, Carlos Guerrero-Sánchez, Juergen Vitz, Richard Hoogenboom, Ulrich S. Schubert. Recent developments in the utilization of Green solvents in polymer chemistry. *Chemical Society Reviews* (2010), 39(8):3317.
203. D. Magioris, A.H. Alexopoulos, E.G. Chatzi, C. Kiparissides. Prediction of Particle Size Distributions in Suspension Polymerization Reactors: Effect of Turbulence Nonhomogeneity. *Chemical Engineering Science* (2000), 55: 4611.
204. K. Hosoya, K. Yoshizako, Y. Shirasu, K. Kimata, T. Araki, N. Tanaka, J. Haginaka. Molecularly imprinted uniform-size polymer-based stationary phase for high-performance liquid chromatography. Structural contribution of cross-linked polymer network on specific molecular recognition. *Journal of Chromatography A* (1996), 728(1-2):139-147.
205. L. Komsta, G. Misztal, E. Majchrzak, A. Hauzer. Separation of fibrates-type antihyperlipidemic drugs by capillary electrophoresis and their quantitation in pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (2006), 41(2):408-414.
206. Boletín terapéutico andaluz. Monografías: Medicamentos y lactancia. Año 2001, nº19.
207. Kazue Takeba, Kenji Fujinuma, Tomoyuki Miyazaki, Hiroyuki Nakazawa. Simultaneous determination of b-lactam antibiotics in milk by ion-pair liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* (1998), 812(1-2):205-211.
208. <http://www.codexalimentarius.net/pestres/data/commodities/details.html?id=187>.

**Determinación de residuos farmacéuticos en
alimentos y muestras medioambientales.
Evaluación de su toxicidad con larvas de pez
zebra.**

**ANEXO A. Polímeros de impresión molecular
(MIPs)**

A.1. INTRODUCCIÓN

Además de la problemática de la contaminación de las aguas, además, hay un interés creciente en el análisis de productos lácteos, cárnicos y de pescado, más enfocado a muestras alimentarias debido a la incorporación de una gran variedad de contaminantes a los seres humanos y animales a través de la cadena trófica. Dentro de los productos lácteos, se encuentra la leche como representante principal. Los medicamentos y otros compuestos químicos presentes en las madres de lactantes podrían afectar a los mismos. Se estima que entre el 90-99% de las madres utilizan algún medicamento durante la primera semana después del parto y, por tanto, es importante estimar los riesgos que pueden conllevar al niño. Como norma general, no es necesario interrumpir la lactancia antes de asegurarse que realmente supone un riesgo para el niño puesto que, excepto algunos medicamentos concretos, la mayoría no suponen ningún problema para su salud. Adicionalmente, que un medicamento se excrete en la leche materna no implica necesariamente toxicidad para el lactante, ya que tendría que alcanzar determinadas concentraciones para originar efectos adversos en el lactante; y en la mayoría de los casos los niveles plasmáticos alcanzados son de escasa relevancia clínica¹⁷⁸.

Se considera que la cantidad de leche que ingiere un niño que se alimenta exclusivamente mediante lactancia materna es de aproximadamente $150 \text{ mL} \cdot \text{Kg}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$; a medida que el niño crece, y empieza a recibir otros aportes alimenticios, lógicamente disminuye el riesgo de exposición a medicamentos por esta vía. No obstante, la absorción de un medicamento por medio de la lactancia, en pequeñas cantidades pero repetidas, podría dar lugar a su acumulación, debido a la inmadurez del metabolismo hepático (especialmente en cuanto a los procesos de acetilación, oxidación y glucuronidación) y de la excreción renal.

La excreción de los medicamentos a través de la leche de la madre se realiza tanto por difusión pasiva como por medio de sustancias transportadoras; aunque la mayoría de los medicamentos pasan a la leche desde el plasma por difusión pasiva. La cantidad de medicamento que se excreta a través de la leche depende de factores de la madre, del niño y del propio medicamento (**Tabla A.1.**). Entre los factores relacionados con el

fármaco se encuentran su peso molecular, el grado de unión a proteínas plasmáticas, pH, grado de ionización y liposolubilidad. De forma general, los medicamentos de elevado peso molecular y aquellos que se inactivan o alteran en medio ácido (heparina, epinefrina, ciertas penicilinas y cefalosporinas) suelen ser escasamente absorbidos en el tracto gastrointestinal, lo que probablemente hace que la cantidad que llegue al lactante sea muy escasa¹⁷⁸. Los factores que determinan la excreción de los medicamentos en la leche materna pueden ser de dos tipos: factores maternos o bien por factores del niño.

FACTORES MATERNOS

- Composición de la leche: los medicamentos más lipófilos se excretan en mayor concentración en la leche madura que en el calostro.
- Fisiología de la glándula mamaria: cantidad de leche producida, etc.
- Farmacocinética: una insuficiencia hepática y/o renal de la madre podría determinar que aumentase la concentración de un medicamento, con mayor riesgo de paso a la leche.
- Intervalo de administración.

FACTORES DEL NIÑO

- Capacidad de succión del niño y frecuencia de las tomas.
- Tiempo transcurrido desde la administración del medicamento a la madre.
- Biotransformación del fármaco: existen diferencias respecto a los adultos.

La lactancia puede verse afectada por los medicamentos de diferentes formas. Los medicamentos pueden excretarse en la leche de la madre, o bien la lactancia puede ser inhibida o estimulada. Factores como las propiedades fisicoquímicas, ionización (al ser la leche más ácida que el plasma, los medicamentos ligeramente básicos difunden mejor en la leche respecto a los que son ligeramente ácidos), liposolubilidad (aquellos fármacos más liposolubles pasan mejor a la leche materna), peso molecular (a mayor peso molecular del fármaco, mayor dificultad para penetrar en la leche materna) y propiedades farmacocinéticas (absorción gastrointestinal, unión a proteínas plasmáticas,

etc) favorecen o impiden la incorporación de estos compuestos a la leche materna, con las consiguientes consecuencias para el lactante¹⁷⁸.

Dentro de los posibles contaminantes que se pueden encontrar en la leche materna, destacan los reguladores lipídicos de la sangre. En la **Tabla A.1.** se muestran los principales medicamentos de este tipo que se han encontrado en la leche materna¹⁷⁸. En esta tabla, se recogen los distintos hipolipemiantes encontrados, la fuente de riesgo que supone para el lactante (A: compatible con la lactancia; B: Precaución; B*: Precaución por no disponerse de datos sobre su excreción en leche materna; C: Contraindicado) y datos sobre su excreción.

Tabla A.1. Contaminantes hipolipemiantes encontrados en muestras de leche materna.

MEDICAMENTO	FUENTE DE RIESGO	OBSERVACIONES
Atorvastatina	B	No se disponen de datos sobre su excreción en leche materna; si bien se considera probable para las estatinas. Podría afectar a la biosíntesis de colesterol del lactante.
Colestiramina	A/B	No se absorbe en el tracto gastrointestinal. No se excreta en leche materna. Su uso prolongado puede provocar déficit de vitaminas hidrosolubles.
Clofibrato	B	No se disponen de datos sobre su excreción en leche materna; si bien se excreta su metabolito activo (ácido clofíbrico). El clofibrato se utiliza en neonatos para tratar la ictericia
Colestipol	A/B	No se absorbe en el tracto gastrointestinal. No se excreta en leche materna. Su uso prolongado puede provocar déficit de vitaminas hidrosolubles.
Fluvastatina	C	Se concentra en leche materna. Podría afectar a la biosíntesis de colesterol del lactante.
Gemfibrozilo	B	No se disponen de datos sobre su excreción en leche materna. Ha mostrado toxicidad fetal en animales y podría ser potencialmente tóxico para el lactante
Lovastatina	C	No se disponen de datos sobre su excreción en leche materna, ni sobre la significación clínica de la misma en humanos. Si podría afectar a la biosíntesis de colesterol del lactante.

Pravastatina	C	Se excreta en leche materna, al parecer en baja proporción. Podría afectar a la biosíntesis de colesterol del lactante.
Probucol	C	No se disponen de datos sobre su excreción en leche materna, ni sobre la significación clínica de la misma en humanos. Podría afectar a la biosíntesis de colesterol del lactante.
Simvastatina		

No existe una legislación clara sobre la presencia de ácido clofíbrico en leche materna. Debido a su similitud con el herbicida 2,4-D (ácido 2,4-clorofenoxiacético), se toma su límite máximo permitido para establecer la concentración máxima legislada para el ácido clofíbrico en leche, siendo ésta de $0.01 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ ¹⁷⁹. Estos niveles tan bajos obligan a desarrollar métodos muy sensibles, robustos y sencillos que permitan determinar ácido clofíbrico a este nivel de concentración.

De forma general, la leche es una matriz importante para el control de fármacos y sus metabolitos. Los métodos encontrados en la literatura para la determinación de estos compuestos en leche describen el empleo de técnicas cromatográficas como HPLC-UV y existe una tendencia clara para la determinación de multiresiduos mediante el empleo de GC/MS, LC/MS o, incluso LC/MS-MS. Además, la mayoría de los sistemas de detección se centraron en el análisis de pocos compuestos de forma simultánea, a pesar de que en la bibliografía sí existen análisis de varios compuestos empleando LC-DAD, con límites de detección entre $2\text{-}15 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, LC-ESI-Trampa de Iones-MS/MS con LOD de $5 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, o bien, mediante UPLC-TOF-MS, con límites de detección comprendidos entre $6.3\text{-}25 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ¹⁸⁰.

El análisis de muestras medioambientales y biológicas requiere de métodos largos y tediosos. Una alternativa clara que permite el análisis de las mismas de forma sencilla y rápida es mediante el empleo de polímeros de impresión molecular, los cuales llevan a cabo una etapa de limpieza previo al análisis, la cual permite eliminar en mayor medida todos aquellos interferentes que compliquen la identificación y el efecto matriz correspondiente así como permite la cuantificación del analito en las muestras y, además, permiten preconcentrar los mismos a bajos niveles de concentración. Esto, unido a la

necesidad de llegar a concentraciones de $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, hace evidente la necesidad de emplear procedimientos de extracción en fase sólida mediante el empleo de un adsorbente selectivo para ácido clofibrico, como son los polímeros de impresión molecular.

Uno de los principales problemas en el análisis de muestras medioambientales, alimentarias o biológicas es la complejidad de las mismas. Es por ello, que en la mayoría de las ocasiones, se requieren inevitables etapas de extracción de los analitos y, además, es necesario realizar una etapa de limpieza adicional a los extractos obtenidos de las muestras, cuyo principal objetivo es eliminar la mayor parte de los compuestos presentes en la matriz y que puedan interferir en la determinación del analito de interés. Esta etapa de limpieza de las muestras será tanto más eficaz cuanto más selectivo sea el material empleado en dicho proceso.

En esta etapa de limpieza, juegan un papel muy importante los polímeros de impresión molecular (MIPs). La tecnología de impresión molecular está basada en la síntesis de polímeros altamente entrecruzados que presentan propiedades de reconocimiento molecular selectivo hacia los compuestos para los cuales han sido sintetizados. Dicho reconocimiento se basa en la creación, mediante el proceso de polimerización, de cavidades específicas de unión, que son complementarias, en tamaño, forma y funcionalidad química al analito utilizado como analito plantilla en la síntesis del polímero¹⁸¹⁻¹⁸².

La historia de la tecnología de impresión molecular se remonta a 1931, año en el que Polyakov¹⁸³ descubrió que el gel de sílice era capaz de reconocer a determinados aditivos que estaban presentes durante la fabricación y secado del mismo. En los años 70-80, los trabajos desarrollados por Wulff et al.¹⁸⁴, Takagishi y Klotz¹⁸⁵ y Mosbach¹⁸⁶ demostraron la presencia de la impronta o huella molecular en polímeros orgánicos.

Una de las aplicaciones más importantes de los MIPs ha sido su empleo como adsorbentes selectivos en procesos de extracción en fase sólida para la limpieza y/o preconcentración de *muestras*¹⁸⁷⁻¹⁸⁹. Esta etapa del tratamiento de la muestra conlleva una gran dificultad y proporciona uno de los mayores problemas con los que se encuentra

el químico analítico a la hora de efectuar el análisis de muestras medioambientales y agroalimentarias, entre otras. Las extraordinarias características de afinidad y selectividad de estos materiales han hecho que los MIPs hayan sustituido a los adsorbentes basados en el empleo de anticuerpos (inmunosorbentes) en numerosas ocasiones. Otra de sus aplicaciones de mayor auge es su empleo como fases estacionarias para su uso en HPLC y electrocromatografía capilar (CEC), suponiendo una gran ventaja ya que se unifica el proceso de limpieza de la muestra y la determinación de los analitos, lo que permite reducir el tiempo de análisis considerablemente. Además, los MIPs han sido utilizados como fases selectivas en el desarrollo de sensores químicos¹⁹⁰⁻¹⁹¹, para la purificación de compuestos en síntesis orgánica o bien como catalizadores¹⁹²⁻¹⁹³ o incluso para la liberación retardada de productos farmacéuticos en el cuerpo humano¹⁹⁴.

En términos generales, la técnica de impresión molecular se basa en la preparación de un polímero altamente entrecruzado en presencia de un analito (conocido como plantilla) para el cual se desea un reconocimiento selectivo. Inicialmente, se pone en contacto el analito con un monómero adecuado cuya finalidad es la de formar un complejo de pre-polimerización, al que posteriormente se le añade un agente entrecruzante, un iniciador de la reacción y un medio disolvente en el cual se lleva a cabo la polimerización (denominado porogen). Una vez que se ha sintetizado el polímero, se extrae el analito plantilla y se dejan libres los sitios de reconocimiento específico. Esta síntesis consta de tres etapas básicas esquematizadas en la **Figura A.1**. La primera etapa supone el contacto con el analito plantilla y el monómero, lo que da lugar al complejo de pre-polimerización. Dependiendo del enlace formado entre ambos así como su estabilidad, las propiedades del polímero obtenido serán diferentes. A continuación, en la segunda etapa, se lleva a cabo el proceso de polimerización, cuyo mecanismo suele ser, por norma general, de propagación por radicales libres, la cual puede ser inducida térmica o fotoquímicamente. Finalmente, la última etapa, supone la eliminación del analito plantilla de la matriz polimérica, lo que genera huecos o cavidades creadas que son complementarias en tamaño, forma y funcionalidad química al analito plantilla, lo que permite que pueda ser reconocido de forma selectiva.

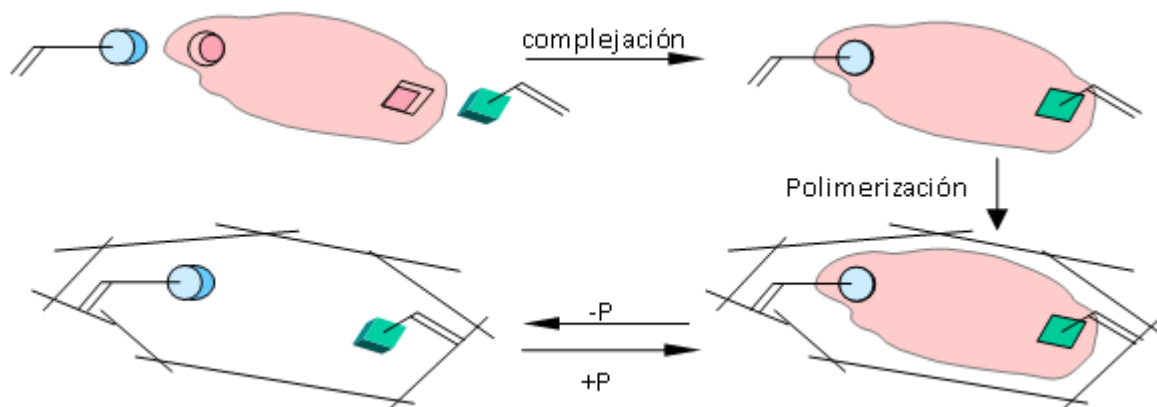


Figura A.1. Etapas implicadas en la síntesis de polímeros generados por impresión molecular (P = analito plantilla).

La síntesis de polímeros de impresión molecular presenta una serie de parámetros a optimizar como la naturaleza y cantidad de monómero, iniciador, entrecruzante y porogen, la forma de iniciación de la polimerización y la metodología empleada, la forma y el tamaño del analito plantilla, entre otras, lo cual resulta muy complejo¹⁹⁵⁻¹⁹⁶.

El método de polimerización llevado a cabo influye sobre la morfología del polímero obtenido, lo cual permite obtener partículas esféricas mono- o polidispersas, partículas de tamaño de poro controlado, agregados aleatorios de partículas, bloques, etc. Además, también puede afectar al reconocimiento de los analitos por parte del polímero.

El método de polimerización es elegido en base a la aplicación del polímero impreso. Por ejemplo, cuando el polímero se va a utilizar como fase estacionaria, los métodos específicos de polimerización son concretos. Dentro de los métodos de polimerización más habituales en la preparación de polímeros de impresión molecular son los siguientes:

- **Polimerización en bloque:** fue el primer método de polimerización empleado en la síntesis de MIPs¹⁹⁷. Este método está basado en la mezcla del analito plantilla, monómero, entrecruzante, iniciador y porogen, los cuales se someten a la polimerización mediante un mecanismo a través de radicales libres, iniciado tanto fotoquímico como térmicamente. Una vez obtenido el polímero, se tritura y tamiza hasta obtener partículas micrométricas amorfas. A continuación, se elimina el

analito plantilla dejando las cavidades libres para el reconocimiento del selectivo del analito de interés.

El inconveniente que presenta este método reside en la necesidad de triturar y tamizar el polímero hasta obtener el tamaño de partícula deseado, debido a que en dicho proceso se pierde una gran cantidad de polímero lo que hace que el rendimiento de la polimerización disminuye drásticamente. Otra de las desventajas es la heterogeneidad en el tamaño de partícula y la forma de las mismas.

- Polimerización por precipitación: se basa en el empleo de un exceso de disolvente, lo que hace que la mezcla de reactivos se encuentre más diluida que en el caso de polimerización en bloque. Como consecuencia, se produce una dispersión de partículas esféricas de polímero independientes en el seno de la disolución¹⁹⁸.

Como principales ventajas de este método, hay que destacar la obtención de partículas esféricas y obtención de un gran rendimiento de polimerización ya que el polímero no se tritura ni se tamiza. Además, en comparación con las partículas obtenidas por polimerización en bloque, éstas poseen una mayor capacidad y una distribución más homogénea de los sitios de unión.

Por lo general, el tamaño de partícula obtenido mediante este procedimiento es muy pequeño (alrededor de 1 μm) lo que genera problemas cuando se emplea como fase estacionaria en técnicas de separación¹⁹⁹.

- Polimerización por suspensión: está basada en la combinación de un medio orgánico hidrofóbico, en el que se encuentra la mezcla de polimerización, y un medio orgánico inmiscible con el anterior en fase acuosa, aunque el empleo de esta última es mucho menos frecuente debido a que dificulta seriamente la interacción entre el analito plantilla y el monómero. La mezcla de ambos medios se agita, de manera que se crean un micro-gota en suspensión en las que tiene lugar la polimerización²⁰⁰. La principal ventaja de este procedimiento es que

permite controlar el tamaño de las partículas, ya sea mediante la adición de un estabilizador (polivinilalcohol o líquidos iónicos) o por el control de la velocidad de agitación²⁰¹⁻²⁰³.

- Polimerización por hinchamiento: fue, inicialmente, descrito por Hosoya²⁰⁴. Está basado en la síntesis de partículas esféricas de látex en medio acuoso y, posteriormente, se produce el hinchamiento de esas partículas por la formación de una microemulsión mediante la adición de dibutilftalato como agente plastificante. A continuación, las partículas de látex se impregnan con la mezcla de pre-polimerización, de forma que se sintetiza una capa de polímero en su superficie.

Los principales inconvenientes del método son la complejidad del mismo y, al llevar a cabo la síntesis en medio acuoso, la interacción mediante la formación de enlaces por puente de hidrógeno entre el analito plantilla y el monómero estaría desfavorecida en el caso de emplear la síntesis no covalente.

- Precipitación en partículas de sílica: de tamaño conocido y posterior redisolución de las mismas. Está basado en la impregnación de las partículas de sílica con la disolución de polimerización. La principal complejidad de este método reside en el estricto control del volumen de disolución de polimerización empleado, ya que no debe ser superior al volumen total de los poros de las partículas de sílica, para evitar la polimerización en el exterior de las mismas o la formación de agregados de partículas.

Tras la síntesis del polímero, este debe triturarse y tamizarse hasta obtener un tamaño de partícula entre 50-100 μm . A continuación, se elimina el analito plantilla con la finalidad de liberar las cavidades formadas. Esta segunda etapa se hace mediante extracción Soxhlet o lavado con disolventes de elevada constante dieléctrica para, finalmente, trasvasarse una pequeña cantidad (100-200 mg) a un cartucho y llevar a cabo las diferentes extracciones en modo discontinuo, constituyendo las etapas de un proceso de

SPE habitual. A modo de resumen, las etapas de un proceso de extracción en fase sólida (SPE) se recogen en la **Figura A.2**.

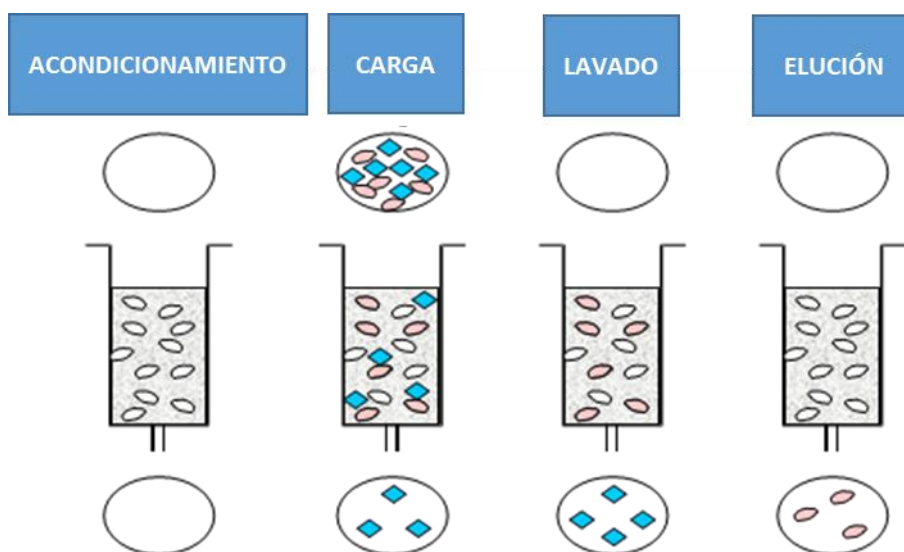


Figura A.2. Etapas implicadas en un proceso de extracción sobre un polímero de impresión molecular (MIP).

Las condiciones de extracción se optimizan en base a la solubilidad de los analitos en los distintos disolventes empleados en cada una de las etapas, con el tipo de interacción entre analito-polímero y en el porogen empleado durante la polimerización. Por tanto, el disolvente más adecuado para efectuar la carga de la muestra será aquel que favorezca la unión entre los analitos y el polímero, siendo el porogen una primera aproximación para considerar. Sin embargo, el solvente empleado en la etapa de elución será aquel que presente mayor facilidad para romper la interacción específica entre el analito y el MIP.

A.2. MATERIALES Y MÉTODOS

A.2.1. Reactivos e instrumentación utilizada

La **Tabla A.2.** muestra los fármacos, reactivos (grado HPLC) y sorbentes utilizados en el desarrollo del método.

Tabla A.2. Fármacos, reactivos y sorbentes empleados en el desarrollo del método analítico.

COMPUESTO	Fórmula empírica/ CASA COMERCIAL
Ácido clofíbrico (CFB)	2-(p-chlorophenoxy)-2-methylpropioniac acid (Sigma Aldrich)
Acetonitrilo (AcN)	Scharlab (Barcelona)
Metanol (MeOH)	Scharlab (Barcelona)
Agua ultrapura	Millipore Ibérica (Madrid)
Ácido metacrílico	Scharlab (Barcelona)
Acetona	(Scharlau)
4-vinilpiridina	Sigma Aldrich (Madrid)
Azobisisobutironitrilo (AIBN)	Sigma Aldrich (Madrid)
Etilenglicol dimetacrilato (EDMA)	Sigma Aldrich (Madrid)
Cartuchos SPE comerciales C-18	Scharlab (Barcelona)
Cartuchos SPE comerciales OASIS MAX	Scharlab (Barcelona)

La instrumentación utilizada se detalla a continuación:

- Sistema de HPLC, que incluye:
 - Desgasificador de membrana (Thermo Separation Products, Madrid)
 - Bomba de alta presión ConstaMetric 4100 Series (Thermo Separation Products, Madrid)
 - Válvula de inyección 7725i Rheodyne con bucle de 200 µL
 - Detector DAD SpectroMonitor 5000 (Thermo Separation Products, Madrid)
 - Columna Kromasil C18 (250mm x 4.6mm, 5 µm) (Scharlab, Barcelona)
- Centrífuga Univapo Concentrator (Biogen Científica, Madrid)
- Bomba de vacío Unijet II (Biogen Científica, Madrid)
- Sistema de extracción a vacío (Varian, Barcelona)

- Sonda de US focalizada (Sonics, Vibracell)

A.2.2. Síntesis de los polímeros generados por impresión molecular

Se ha puesto a punto un método de extracción en fase sólida empleando un polímero de impresión molecular utilizando ácido clofíbrico como analito plantilla. El proceso de polimerización seguido para la síntesis del polímero impreso (MIP) y no impreso (NIP), se detalla a continuación:

1. Analito plantilla: Ácido clofíbrico (1 mmol). Analito plantilla utilizado en la síntesis de MIP.
2. Monómero funcional: MAA/4-vinilpiridina (4 mmol)
3. Entrecruzante: EDMA (20 mmol)
4. Iniciador: AIBN (0.1 mmol)
5. Porogen: Acetonitrilo (15 mL)

Con estas proporciones de disolvente, se obtiene un polímero de precipitación (MIP), con partículas de pequeño tamaño, que es necesario tamizar para obtener un tamaño de partícula inferior.

En un primer paso, se ponen en contacto el analito plantilla y el monómero con el fin de formar el complejo de “prepolimerización” acorde al esquema indicado en la **Figura A.1**. Transcurridos unos minutos, se añade el agente entrecruzante, el iniciador y, finalmente, el porogen. La mezcla resultante se somete a una temperatura de 60-70°C durante 24 horas.

Una vez sintetizados el polímero impreso y no impreso (sintetizado de forma análoga pero sin analito plantilla, conocido como NIP), los polímeros se trituran y tamizan hasta conseguir un tamaño de partícula comprendido entre 50-100 μm . Esta fracción, se somete a un procedimiento de limpieza para eliminar el analito plantilla, mediante una extracción Soxhlet con una mezcla de disolventes MeOH/Ácido acético 50:50 durante 12

h, de tal manera que se crean las cavidades específicas para el reconocimiento del analito y se eliminan los restos de reactivos que no hayan reaccionado.

A.2.3. Procedimiento de extracción en fase sólida (MISPE)

Un proceso de extracción en fase sólida requiere la optimización de las etapas implicadas en el mismo: carga, lavado y elución (**Figura A.2.**), cuyo objetivo principal es obtener la máxima recuperación en el MIP y la mínima interacción del mismo en el NIP.

Para optimizar el proceso MISPE, diferentes cartuchos de extracción son empaquetados con 200 mg de polímero impreso y no impreso. Sobre diferentes réplicas de cada uno, se llevan a cabo el estudio de las cuatro etapas básicas del proceso indicadas en la **Figura A.2.**

El proceso optimizado comprende las etapas que se indican en la **Tabla A.3.**

Tabla A.3. Etapas optimizadas en el proceso MISPE.

ETAPAS	Solvente
Acondicionamiento	50 mL MeOH y 50 mL AcN
Carga	2 mL de ácido clofíbrico en acetonitrilo
Lavado	6% MeOH en acetonitrilo
Elución	20 mL MeOH
Redisolución	Evaporación y redisolución en 1 mL de fase móvil, MeOH/Ácido Fosfórico 10 mM en proporción (70:30 v/v)

A.2.4. Determinación de ácido clofíbrico

La determinación de ácido clofíbrico se lleva a cabo mediante cromatografía líquida acoplada a un diodo array (DAD) como sistema de detección. Para ello, las condiciones cromatográficas son las que se indican en la **Tabla A.4.**

Tabla A.4. Condiciones cromatográficas optimizadas para la determinación de ácido clofíbrico en muestras de leche comercial.

Condiciones cromatográficas	
Análisis	HPLC-DAD
Columna	Kromasil C18 (250mm x 4.6mm, 5 µm)
Fase móvil	MeOH/Ácido fosfórico 10 mM (v/v 70:30)
Flujo	1 mL/min
Volumen de inyección	200 µL
Detección	227 y 279 nm
Elución	Isocrática

Para la cuantificación de ácido clofíbrico se utilizó un calibrado externo en el rango adecuado de trabajo preparado diariamente a partir de solución stock de ácido clofíbrico en acetonitrilo.

A.2.5. Muestras de leche comercial

La determinación de ácido clofíbrico se ha llevado a cabo a partir de muestras de leche sometidas a dos tratamientos diferentes:

PROCESO 1: En primer lugar, con objeto de estudiar la influencia del resto de la matriz en la determinación del analito, se ha realizado un proceso de precipitación de proteínas en una muestra de leche comercial, en el cual se tratan 5 mL de leche con 15 mL de AcN. La mezcla se mantiene en reposo durante 30 minutos y a continuación, se centrifuga (a 15° y 15 rcf). Tras la centrifugación, el extracto se fortifica con una disolución de ácido clofíbrico en acetonitrilo (etapa de carga) y se lleva al cartucho de extracción en fase sólida empaquetado con el polímero impreso de ácido clofíbrico al que se somete a las diferentes etapas del proceso MISPE optimizado.

PROCESO 2: En segundo lugar, para simplificar el tratamiento de la muestra, se ha llevado a cabo un método de análisis fortificando las muestras de leche directamente, sin necesidad de llevar a cabo el proceso de precipitación de proteínas previo. A continuación, la leche enriquecida en ácido clofíbrico se adicionó sobre el cartucho empaquetado con el MIP y se aplicaron las diferentes etapas del proceso MISPE.

A.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A.3.1. Optimización de la separación cromatográfica mediante HPLC-DAD

Se ha llevado a cabo un estudio que ha permitido seleccionar la fase móvil más adecuada, la cual debe permitir alcanzar un compromiso entre el tiempo del análisis (tiempo de retención del analito, t_R) y, la resolución entre dos picos consecutivos. Además, la fase móvil a elegir debe ser compatible con la etapa de elución del proceso MISPE. Acorde a la bibliografía, las fases móviles más adecuadas están basadas en AcN/Ácido fosfórico, Hexano/2-propanol o bien mezclas de MeOH/Ácido fosfórico²⁰⁵.

El resultado obtenido concluye que fases móviles que contienen AcN, dan lugar a la aparición de picos cromatográficos de ácido clofíbrico no simétricos con un frente que dificulta notoriamente su cuantificación, por lo que fue descartada. Por tanto, se evaluaron fases móviles de metanol con diferentes proporciones de ácido fosfórico a distintas concentraciones. La **Tabla A.5.** muestra los resultados obtenidos en relación a los tiempos de retención de ácido clofíbrico obtenido para cada proporción y concentración de ácido fosfórico evaluado. En esta tabla se observa que un aumento en la concentración de ácido fosfórico disminuye muy ligeramente los tiempos de retención, pero, por el contrario, la presencia de ácido fosfórico como eluyente en el proceso MISPE, implica emplear tiempos de evaporación del extracto final superiores y, además, etapas de acondicionamiento de la columna largas para evitar su cristalización. Por ello, se seleccionó una concentración de 10 mM como concentración de ácido fosfórico óptimo para usarlo como componente de la fase móvil. Un aumento de la proporción de metanol (> del 70%) se descartó, ya que si bien disminuía el t_R , daba lugar a una resolución baja, dado que su factor de capacidad se hace muy pequeño ($(t_R - t_M)/t_M$ (donde t_M : 3.1 min).

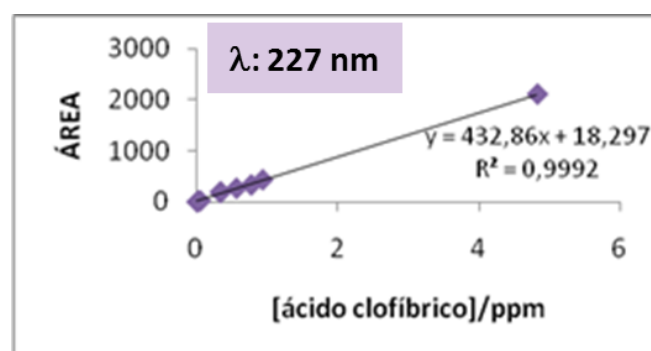
Tabla A.5. Tiempos de retención obtenidos para cada proporción utilizada.

	MeOH/Agua (70:30)	MeOH/ H ₃ PO ₄ 10 mM (80:20)	MeOH/ H ₃ PO ₄ 10 mM (70:30)	MeOH/ H ₃ PO ₄ 20 mM (70:30)	MeOH/ H ₃ PO ₄ 30 mM (70:30)	MeOH/ H ₃ PO ₄ 40 mM (70:30)
t_R (min)	13.0	4.7	9.6	9.3	8.9	8.7

A la vista de los resultados obtenidos, se seleccionó como fase móvil la formada por MeOH/Ácido Fosfórico 10 mM en proporción 70% de MeOH y 30% de ácido fosfórico, de tal forma que permite obtener el ácido clofíbrico en 9.6 minutos. A pesar de que otras fases móviles evaluadas presentaban un tiempo de retención menor, se ha seleccionado éste como óptimo, ya que es necesario separar el pico del ácido clofíbrico de la matriz de la muestra así como del pico de inyección y, además, se consigue mejorar el límite de detección y aumentar la sensibilidad de forma notable.

En estas condiciones, se llevó a cabo un calibrado externo medido a 227 y 279 nm. La medida realizada a 227 nm (**Figura A.3.a**) tiene una mayor sensibilidad pero está sujeta a un mayor número de interferencias, aunque se eliminarán posteriormente en el proceso MISPE (**Figura A.3.**). El límite de detección medido como $3S_b/pte$ es de $6 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y la precisión medida como la desviación estándar, R.S.D., es de 3% para una concentración de $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $n=3$.

a)



b)

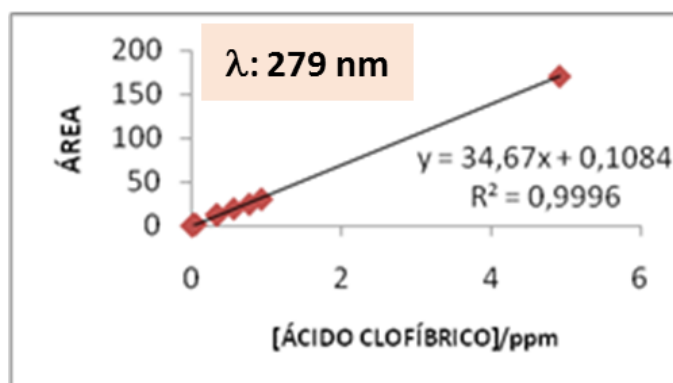


Figura A.3. Calibrado de ácido clofíbrico en MeOH/Ácido fosfórico medido a 227 nm (a) y 279 nm (b) en un rango de concentración entre de 0 y $5 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$.

A.3.2. Síntesis del polímero impreso de ácido clofíbrico

Se han sintetizado dos clases de polímeros según lo indicado en el apartado A.2.3. *Procedimiento de extracción en fase sólida (MISPE)*, diferenciado únicamente en el monómero empleado: ácido metacrílico o 4-vinilpiridina. Paralelamente, se sintetizaron los correspondientes polímeros no impresos (NIP), en ausencia de la plantilla de ácido clofíbrico.

Una vez obtenidos ambos polímeros, se empaquetaron 200 mg de cada polímero en sendos cartuchos y se hizo pasar a través del cartucho 2 mL de una disolución de $6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ácido clofíbrico en AcN. Posteriormente, se evaluó la cantidad de ácido clofíbrico en la disolución de la carga recogida y se calculó la recuperación. Los resultados se recogen en la **Tabla A.6**.

Tabla A.6. Recuperación (%) obtenido para cada etapa en el polímero MIP y NIP sintetizado.

Monómero empleado en la síntesis del polímero	% Recuperación	
	Polímero no impreso	Polímero impreso
4-vinilpiridina	73%	15%
Ácido metacrílico	73%	73%

Según los resultados mostrados, el polímero sintetizado con 4-vinilpiridina como monómero, tiene claramente un efecto de impresión para ácido clofíbrico que no lo presenta el polímero de ácido metacrílico, ya que, en este caso, parece que no hay retención o ésta es inespecífica. Por esta razón, se escoge el polímero sintetizado con 4-vinilpiridina para los estudios posteriores.

A.3.3. Optimización del proceso MISPE

Mediante la realización de ensayos de extracción en fase sólida (SPE) fuera de línea, se seleccionaron las condiciones óptimas de las etapas de carga, lavado y elución, para lo cual, se rellenaron cartuchos con 200 mg de material polimérico sintetizado previamente. Igualmente, se realizaron ensayos paralelos con el polímero no impreso (NIP). En ambos casos, se han llevado a cabo las cuatro etapas clásicas de un proceso de SPE:

a) Inicialmente, se realiza el acondicionamiento del polímero, para el cual se emplean 50 mL de MeOH y 50 mL de AcN, de tal manera que se garantiza que las cavidades generadas se quedan en las condiciones óptimas para retener el analito de interés en la etapa de carga.

b) Como medio para la carga de la muestra o de las soluciones estándar, se ha seleccionado acetonitrilo, ya que las interacciones específicas más fuertes generalmente tienen lugar cuando la carga se realiza en el mismo medio que el empleado en la polimerización.

c) La optimización de la etapa de lavado se lleva a cabo con el fin de eliminar cuantitativamente las interacciones inespecíficas sin afectar a las interacciones específicas entre ácido clofíbrico y las cavidades generadas en el polímero impreso. La disolución de lavado óptima será aquella que permita eluir el analito de interés del polímero no impreso pero lo mantenga dentro de sus cavidades en el MIP. Para ello, se parte de la hipótesis que al presentar una matriz polimérica análoga, las interacciones inespecíficas son similares en ambos polímeros, MIP y NIP.

Para optimizar la disolución de lavado, se han probado distintas mezclas metanol – acetonitrilo, en las que se fue variando la proporción de metanol entre 0 y 10 %. Posteriormente, se ha evaluado la cantidad de ácido clofíbrico que se queda retenido tras dicho proceso (en MIP y NIP), de forma que la disolución óptima será aquella en la que se minimice la recuperación en el NIP (de esta forma se garantiza una máxima eliminación de los compuestos unidos inespecíficamente) sin disminuir la recuperación obtenida en el

MIP, para evitar que las interacciones específicas se vean afectadas como consecuencia del proceso de lavado del polímero.

d) En todos los casos, se cargaron 2 mL de ácido clorhídrico de $6 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y el volumen de la disolución de lavado fue de 5 mL. En la **Tabla A.7.**, se muestra la variación de la recuperación obtenida en los polímeros MIPs y NIPs en función del porcentaje de metanol presente en la disolución de lavado. Los resultados obtenidos muestran que, a medida que aumenta la polaridad de esta disolución, se eliminan las interacciones inespecíficas y el analito se eluye del polímero NIP cuando un 6% de metanol está presente en la disolución de lavado (acetonitrilo). En estas condiciones, el analito sigue retenido en el MIP debido a interacciones específicas. Por todo ello, se elige 6% de MeOH en AcN como % óptimo en la disolución de lavado, obteniendo para estos resultados una desviación estándar media de 2.3%.

Tabla A.7. Composición de las diferentes disoluciones de lavado empleadas y % de recuperación obtenido en la fracción de lavado al incrementar el contenido de MeOH en la disolución de lavado.

Nº experimento	% MeOH-Acetonitrilo	NIP (%)	MIP (%)
1	0%	55	3
2	2%	62	4
3	4%	68	6
4	6%	71	6
5	8%	72	8
6	10%	71	7

e) Por último, se ha optimizado la última etapa del proceso MISPE, la etapa de elución. Para ello, se emplean diferentes medios de elución, en donde se utilizan diferentes volúmenes de MeOH y diferentes proporciones de fase móvil. Los resultados se muestran en la **Tabla A.8.**

Tabla A.8. % Recuperación obtenidos en la optimización de la etapa de elución.

VOLUMEN	MEDIO	% RECUPERACIÓN
1 mL	MeOH	0
5 mL	MeOH	31
10 mL	MeOH	37
20 mL	MeOH	75
1 mL	MeOH/ H ₃ PO ₄ 10 mM (80:20)	15
5 mL	MeOH/ H ₃ PO ₄ 10 mM (80:20)	29

Según se observa en la **Tabla A.8.**, se eligen 20 mL de MeOH como medio óptimo de elución, ya que es el único medio que permite obtener mayor recuperación del analito. A pesar de que, para distintas proporciones de fase móvil, la recuperación es mayor con menor volumen, implicaría aumentar éste para obtener una mayor recuperación y por consiguiente, habría que introducir una etapa de evaporación y redisolución, lo que hace que en medio ácido no sea viable.

En las condiciones óptimas, se realizaron sucesivos experimentos del proceso MISPE completo, carga, lavado y elución, obteniendo los resultados que se muestran en la **Tabla A.9.**, en donde se muestra el % recuperación obtenido en el NIP y MIP en la fracción de elución para las condiciones evaluadas, diferenciándose únicamente en las condiciones de lavado, las cuales vienen dadas por el contenido de MeOH en acetonitrilo (**Figura A.4.**) en las distintas réplicas evaluadas en cada caso (n = 3).

Tabla 9. % Recuperación obtenido en el NIP y MIP durante la etapa de elución en función del contenido de MeOH en AcN en la fase de lavado.

% MeOH-AcN	NIP (%)	MIP (%)
0%	19	87
2%	10	81
4%	7	78
6%	1	80
8%	0	77
10%	0	73

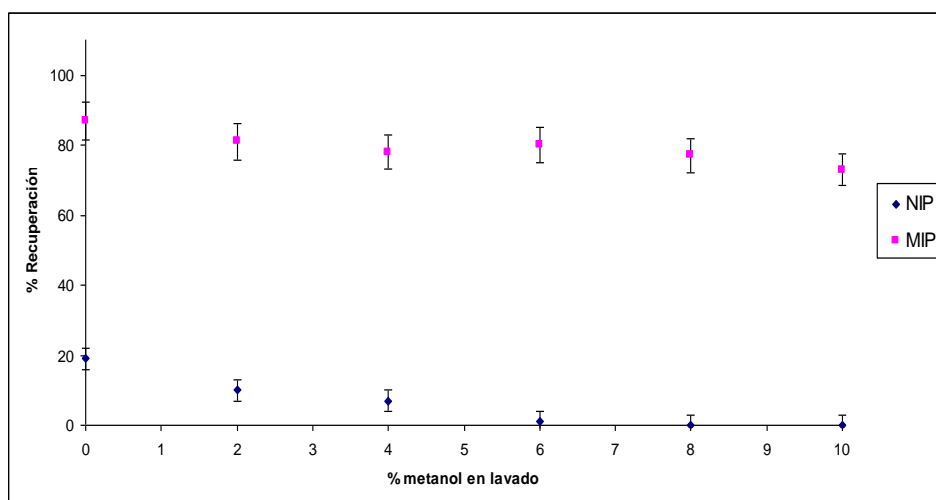


Figura A.4. % Recuperación obtenido en el NIP y MIP bajo diferentes condiciones en la fracción de elución.

A la vista de los resultados en estos experimentos, el método que permite obtener una elevada recuperación y selectividad en el proceso de extracción en fase sólida de ácido clofíbrico en el polímero impreso se muestra en la **Figura A.5**.

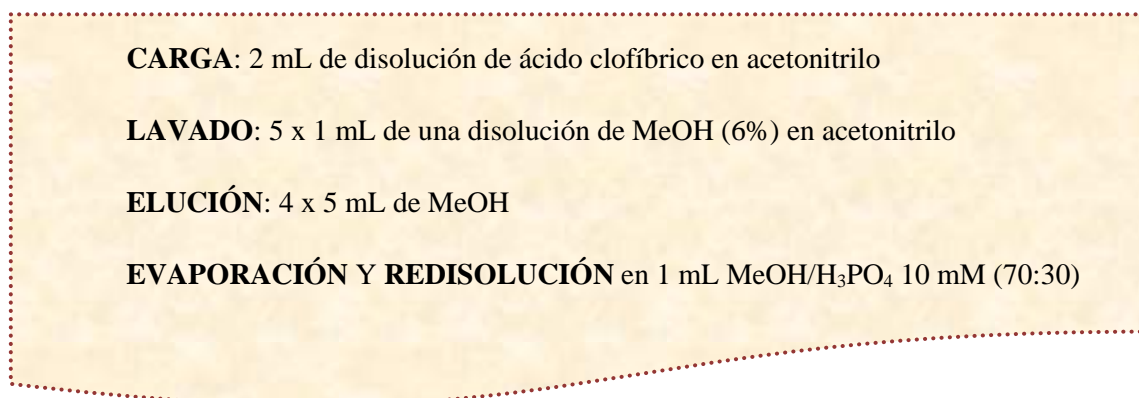


Figura A.5. Etapas globales implicadas en el proceso MISPE optimizado.

A.3.4. Caracterización físico-química del polímero impreso: isoterma de adsorción

Una vez optimizado el proceso MISPE, se lleva a cabo la caracterización física-química del polímero impreso con el fin de profundizar en el mecanismo de interacción del polímero con ácido clofíbrico. En dicho mecanismo, se ha evaluado la isoterma de adsorción, la cual permite estudiar el funcionamiento del polímero en un amplio intervalo de concentraciones. De entre todos los modelos disponibles para el ajuste de los datos experimentales, se ha seleccionado el modelo de Langmuir-Freundlich, que aplica la siguiente ecuación:

$$B = \frac{N \cdot a \cdot F^m}{1 + a \cdot F^m}$$

donde B es la cantidad de ácido clofíbrico enlazada al polímero en el equilibrio, F es la cantidad de ácido clofíbrico que permanece en la disolución una vez alcanzado el equilibrio, N es la capacidad del polímero, a es el parámetro relacionado con la constante de afinidad mediante la expresión $K = a^{1/m}$ y m es el coeficiente de homogeneidad.

El modelo de Langmuir-Freundlich se utiliza muy frecuentemente ya que es capaz de caracterizar correctamente materiales tanto homogéneos como heterogéneos que presenten un grado de afinidad intermedio (un polímero totalmente homogéneo

presenta una $m = 1$). La **Figura A.6.** muestra la representación del ajuste obtenido y la **Tabla A.10.** resume los parámetros que caracterizan el polímero.

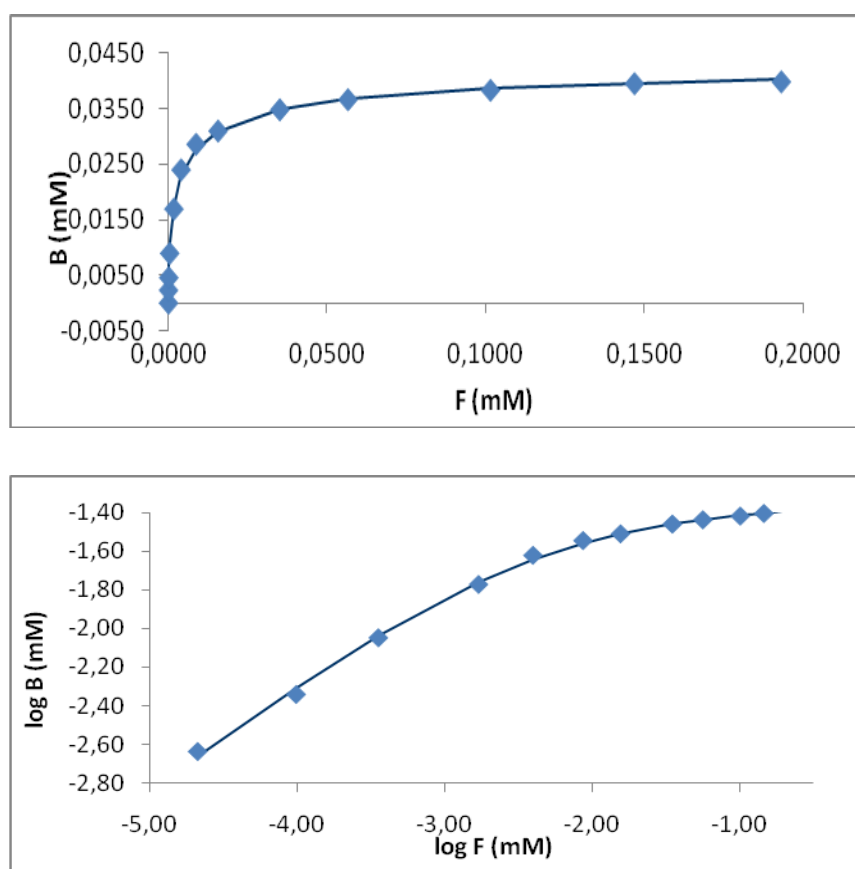


Figura A.6. Representación del ajuste a la isoterma de Langmuir-Freundlich; $R = 0.999$.

Tabla A.10. Parámetros obtenidos del ajuste a la isoterma de Langmuir-Freundlich.

N ($\mu\text{mol/g}$)	a (mM)	m	K (mM)	R
0.444	24.7	0.573	269.8	0.999

A.3.5. Comparación del proceso MISPE con SPE empleando adsorbentes no selectivos comerciales

Por último, el grado de selectividad y la eficacia de la utilización del MIP, si bien se ha demostrado en los experimentos llevados a cabo, es necesario demostrar su utilidad en comparación con la utilización en la etapa de “*clean up*” de adsorbentes no selectivos como son NIP, OASIS MAX y CARTUCHOS C₁₈.

En este caso, se pueden seguir dos procedimientos:

1. Emplear el proceso MISPE optimizado para el polímero de CFB/4-VP, y comparar en condiciones similares.

2. Emplear el procedimiento establecido para la determinación de ácido clofíbrico en cada cartucho. En este caso, al emplear mayor número de reactivos y mayor consumo de disolventes, se ha descartado este procedimiento, por ser más tedioso. Además, requiere dos etapas de limpieza, una etapa de elución, evaporación y reconstitución en 250 mL de fase móvil (NH_4COOH y MeOH), lo que alarga el proceso considerablemente. El procedimiento descrito está optimizado para muestras de agua lo que hace que, al utilizar otra matriz, se tenga que optimizar el proceso de extracción para el cartucho comercial.

Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla A.11**.

Tabla A.11. % Recuperación obtenida empleando adsorbentes no selectivos comerciales.

CARTUCHO	RECUPERACION (%)
C-18	0%
OASIS MAX	1%
MIP CFB/4-VP	80%
NIP CFB/4-VP	1%

A la vista de estos resultados es obvio que únicamente la aplicación del método de limpieza propuesto basado en la utilización de un polímero de impresión molecular cuyo monómero es la 4-vinilpiridina y como analito plantilla ácido clofíbrico produce resultados positivos con altas recuperaciones.

A.3.5. Comparación del proceso MISPE con SPE empleando adsorbentes no selectivos comerciales

La síntesis del polímero de impronta molecular para ácido clofíbrico tiene como objetivo final emplearlo en un proceso MISPE para la determinación de este analito en muestras de leche de distintos orígenes: materna y de vaca. Debido a que en el momento de su aplicación, no se dispone de leche materna, se ha desarrollado el método empleando muestras de leche comercial fortificadas con ácido clofíbrico.

La leche es una suspensión de grasas en una solución de proteínas, hidratos de carbono (en donde predomina la lactosa) y sales minerales. Es isoosmótica y más ácida que el plasma (pH 6.8-7) y su composición varía según las fases de su secreción²⁰⁶:

- Calostro: aparece entre los primeros 3-4 días tras el parto. Es alcalino (pH 7.45), rico en vitamina K, proteínas, sodio, potasio y minerales. Es pobre en azúcar y grasa.
- Leche de transición: se segrega aproximadamente hacia la tercera semana. Su contenido va aumentando en azúcar y grasa.
- Leche completa o madura: es más ácida que el plasma (pH: 7-7.71) y presenta mayor contenido en grasa.

La leche humana, a diferencia de otros mamíferos, presenta una concentración más baja de iones monovalentes y más alta de lactosa²⁰⁶.

Debido al alto contenido en proteínas y grasas es necesario poner a punto un método de determinación de ácido clofíbrico en una muestra similar a la leche materna como es la leche comercial. A continuación, se explica el tratamiento de la muestra y el método llevado a cabo para determinar ácido clofíbrico en leche.

A.3.6. Determinación de ácido clofíbrico en muestras de leche comercial

En primer lugar se determinó el ácido clofíbrico en extractos de muestras de leche una vez eliminadas las proteínas, con objeto de estudiar la influencia del resto de la matriz en la determinación del analito.

Para obtener el extracto, es necesario preparar la muestra previamente, para lo cual, es necesario desnaturalizar las proteínas. Este paso se puede hacer con ácido trifluoroacético (TFA), AcN o NaCl (que tiene mayor fuerza iónica), pero se utiliza AcN ya que es en éste en el que se ha llevado a cabo el proceso MISPE y siempre es más aconsejable utilizar el mismo disolvente que el empleado como porogen en la síntesis del polímero^{20, 207}. El procedimiento a seguir se muestra en la **Figura A.7**.

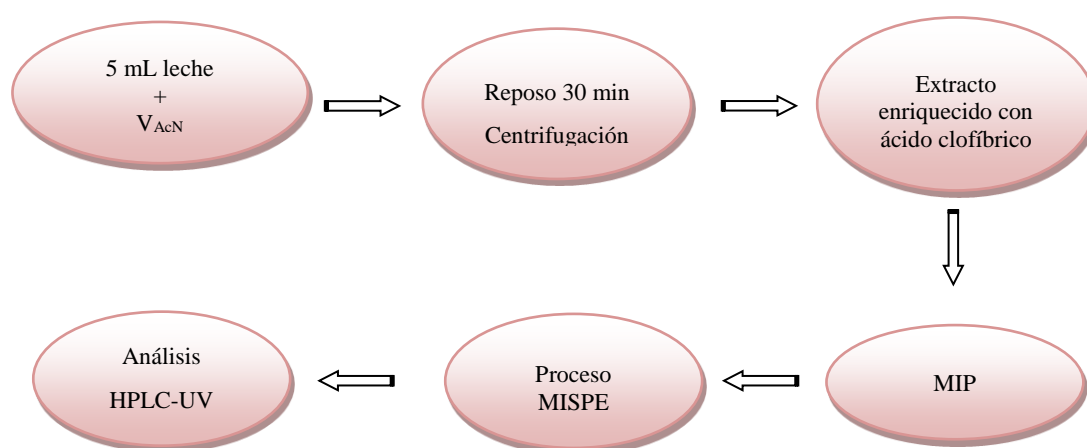


Figura A.7. Procedimiento optimizado para la determinación de ácido clofíbrico en muestras de leche comercial.

Para el tratamiento de la muestra, se cogen 5 mL de leche y se tratan con distintos volúmenes de AcN, de tal manera que permite evaluar qué cantidad del mismo hace precipitar mayor cantidad de proteínas. A continuación, se mantiene en reposo durante 30 minutos aproximadamente y, transcurrido este tiempo, el precipitado obtenido se seca en la estufa durante 2 horas a 40°C. Los resultados obtenidos en la etapa de precipitación se muestran en la **Tabla A.12**.

Tabla A.12. Cantidad de proteínas precipitadas para 5 mL de leche con distintos volúmenes de AcN.

MUESTRA	V _{AcN} (mL)	PESO PRECIPITADO
1	8	363,0
2	10	400,0
3	12	424,7
4	15	627.5
5	18	450,6
6	20	436.1
7	25	424.2
8	30	449.5
9	35	435.4

A la vista de los resultados, 15 mL se selecciona como volumen óptimo de AcN, ya que es la cantidad que hace precipitar mayor cantidad de proteínas, favoreciendo así la limpieza de la muestra.

Una vez evaluado el volumen óptimo necesario para desnaturalizar las proteínas, el siguiente paso fue fortificar el extracto de leche obtenido con ácido clofíbrico a diferentes niveles de concentración y someterlo al proceso MISPE optimizado. El cromatograma, una vez inyectado dicho extracto en el cromatógrafo, se muestra en la **Figura A.8.**, en la cual se puede observar la determinación de ácido clofíbrico en extractos de leche enriquecida (azul claro) y sin enriquecer antes (azul oscuro) y después de pasar por el MIP (rosa). En el cromatograma se representa claramente la elevada selectividad que presenta el polímero de MIP/4-VP, el cual permite llevar a cabo la limpieza de muestras de leche de forma rápida y sencilla y la cuantificación de ácido clofíbrico en la misma.

Como puede observarse en la **Figura A.8.**, dada la influencia del MIP en las muestras de leche comercial, se hace evidente la necesidad de usar polímeros de impresión molecular para la determinación de ácido clofíbrico en este tipo de muestras, lo que permite llevar a cabo una etapa de limpieza efectiva así como la determinación del analito de interés en un tiempo de tratamiento muy breve y minimizando la influencia de la matriz en el análisis.

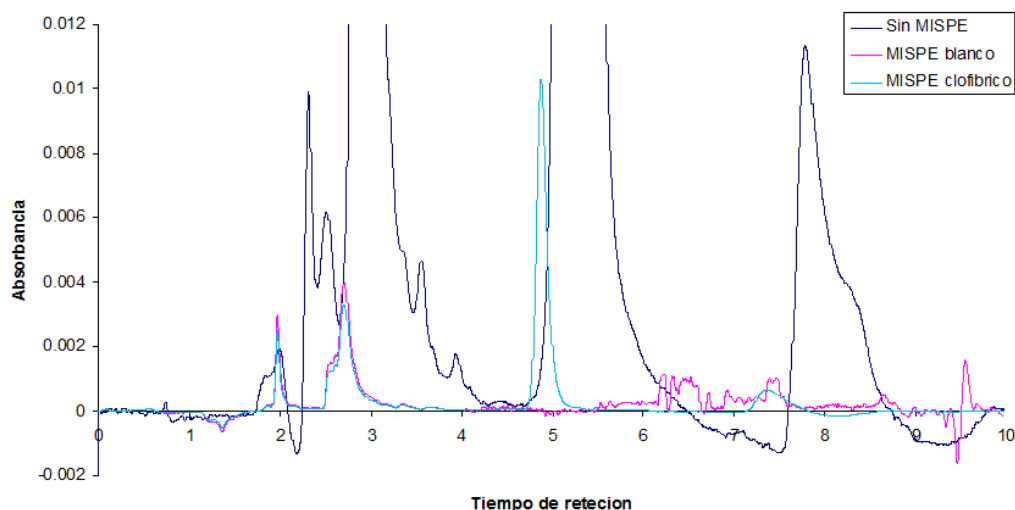


Figura A.8. Cromatogramas obtenidos para el análisis de muestras de leche enriquecida con ácido clofibrico ($100 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$).

El cromatograma obtenido a 279 nm no está influenciado por la presencia de la matriz, lo que justifica la necesidad del empleo de este polímero de impresión durante el procedimiento. El LD obtenido es de 15 ng/mL , límite que resulta superior al recomendado en la legislación por lo que se descartó medir a esta λ .

Todos estos resultados conducen a la necesidad de trabajar a 227 nm empleando un MIP selectivo para ácido clofibrico para llevar a cabo la limpieza de la muestra de leche.

El límite de detección a 227 nm, para determinar ácido clofibrico en los extractos de leche es de $6 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, siendo la RSD de 10%. La recuperación del analito en los extractos es de 77%, porcentaje obtenido al interpolar las áreas bajo el pico cromatográfico en el calibrado externo.

A.3.7. Determinación de ácido clofibrico en muestras de leche comercial de forma directa

La metodología descrita en el apartado anterior, si bien simplifica notoriamente el método descrito en bibliografía, conlleva un tratamiento de muestra largo y, sobre todo, puede dar lugar a la pérdida del analito en el proceso de precipitación de las proteínas.

Por ello, se inició una investigación encaminada al desarrollo de un método de análisis que permitiese determinar ácido clofibrico directamente en las muestras de leche sin

necesidad de llevar a cabo la etapa de precipitación de las proteínas. Para ello, se enriqueció la muestra de leche con el ácido clofíbrico a dos niveles de concentración, 50 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ y 300 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$. A pesar de que no hay una legislación vigente para la determinación de ácido clofíbrico en leche, se establece el nivel máximo permitido del 2,4-D, 10 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, debido a su semejanza en su estructura. A pesar de que no hay una legislación vigente para la determinación de ácido clofíbrico en leche, se establece el nivel máximo permitido del 2,4-D, 10 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, debido a su semejanza en su estructura²⁰⁸.

La leche enriquecida sin ningún tipo de tratamiento previo se pasó a través del cartucho empaquetado con el polímero de impronta molecular para ácido clofíbrico y se le aplicó las distintas etapas del proceso MISPE. A continuación, el extracto eluido en la fase móvil se inyectó en el cromatógrafo y se cuantificó este analito a 227 nm. La **Figura A.9.** muestra el cromatograma obtenido de una muestra de leche comercial fortificada con 50 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$. La recuperación media de ácido clofíbrico obtenida mediante este procedimiento es del 99% ($n=3$; RSD = 12%).

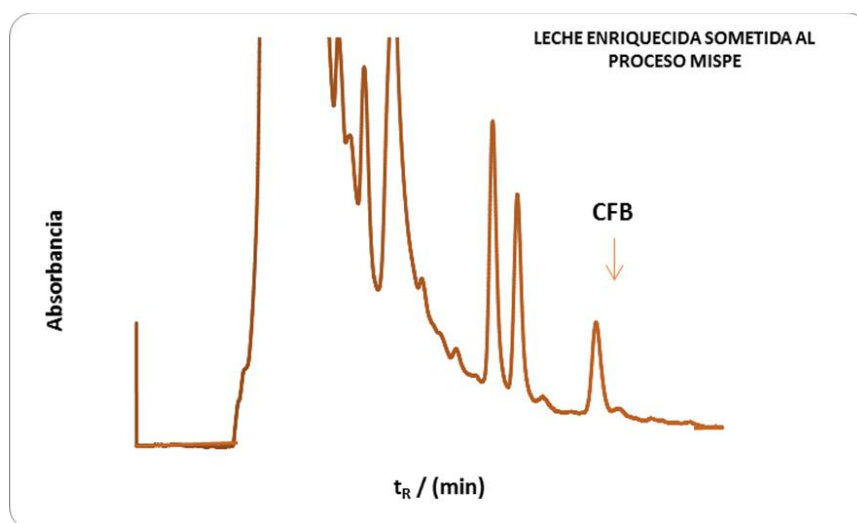


Figura A.9. Cromatograma correspondiente al extracto eluido en la fase móvil tras el proceso MISPE de leche enriquecida para 50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de ácido clofíbrico.

Este resultado demuestra la bondad del MIP que permite aplicar directamente el método de análisis sin llevar a cabo la precipitación de las proteínas, lo que acorta y simplifica drásticamente el método de análisis.

**Determinación de residuos farmacéuticos en
alimentos y muestras medioambientales.
Evaluación de su toxicidad con larvas de pez
zebra.**

Anexo B. Publicación científica - Review

RESEARCH ARTICLE



Sample Treatment in Organic Compound Determination: A Green Chemistry Perspective



Noemí M. Fernández^a, Ana M. Coto-García^b, Raquel Gonzalo-Lumbreras, Jon Sanz-Landaluze, Concepción Pérez-Conde and Carmen Cámara*

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Complutense University of Madrid, Campus of Moncloa, 28040 Madrid, Spain

ARTICLE HISTORY

Received: December 03, 2015
Revised: March 07, 2016
Accepted: May 13, 2016

DOI:
10.2176/2213347X16052613
0744

Abstract: *Background:* Analysis of organic compounds in several complex matrices is a growing need and great efforts have been made to achieve analytical characteristics for their quantification or identification in small samples. Sample treatment in terms of time spent, and the use of large amounts of solvents, generating considerable amounts of wastes are the most limiting aspects of an analytical method.

Methods: Here, we review the features of different extraction and cleaning techniques for organic compound determination from a green chemistry perspective.

Results: The large number of techniques discussed in this review implies a great advance in comparison to conventional extraction techniques in terms of solvent consumption, extraction time or automation. The current trend of miniaturization of the extraction process is a viable alternative from a Green Chemistry perspective. Miniaturization involves reduction of amounts of organic solvents and wastes, and also the contamination risk or analyte losses. Thus, automation of the whole analytical process is facilitated. Final decision regarding the extraction technique to choose in each analysis will depend on the type of compounds to be determined, the type of sample or matrix and their concentration. Combination of microextraction techniques with novel extractants or new solvents will open the door either to improve current extraction techniques or to develop new ones aiming to diminish environmental damage and enabling the automation of the process.



C. Cámara

Keywords: Miniaturized, sample treatment, organic compounds, environmental samples.

INTRODUCTION

Persistent organic pollutants (POPs) are a heterogeneous group of organic compounds that are lipophilic and resistant to environmental degradation; consequently, they have a propensity to accumulate in human or animal tissues, negatively affecting human or animal health, as well as the environment. Conventional POPs includes: Polychlorinated Biphenyls (PCBs), Polychlorinated Dibenzo-p-Dioxins and Polychlorinated dibenzofurans (PCDD/Fs), Organo Chloride Pesticides (OCPs), and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) [1]. Besides conventional POPs, emerging pollutants, such as polybrominated diphenyl ethers (PBDEs), have distribution patterns or properties similar to that of POPs. Furthermore, over the last years, drug use by humans and animals has increased, which, besides being a public health problem, may have a negative impact on the environment. The presence of drugs and their residues has already been detected at low concentrations in surface waters [2]. These evidences support the scientific and public concern on the potential environmental damage. Thus, priority must be given to the analysis of these organic compounds from different environmental samples.

The European Union regulates the amount and use of chemicals through the Regulation on Registration, Evaluation, and Authorization of Chemicals (REACH), aiming to protect human health and the environment [3, 4]. Different evaluations of the chemical and ecotoxicological properties of a specific substance are required by REACH regulations, considering their annual production quantities or the hazard for by substances considered persistent, bioaccumulative, and toxic (PBTs). On the other hand, the work carried out in laboratories while studying a specific pollution problem can help cause additional contamination problems [5]. For example, sample extraction involves using large amount of organic solvents, leading to the generation of new wastes [5, 6]. Analytical chemists could develop greener analytical methods for a more environmentally friendly chemistry.

In 1998 Anastas *et al.* [7] defined Green Chemistry as the utilization of a set of principles that reduces or eliminates the use or generation of hazardous substances in the design, manufacture, or application of chemical products. Analytical chemistry can have a relevant role in Green Chemistry through the development of new analytical methods or the modification of those that constitute a hazard to human health or to the environment. One of the primary objectives of Green Analytical Chemistry (GAC) [5] is to eliminate or significantly reduce the currently used reagents, particularly organic solvents, from analytical procedures, for waste minimization (Fig. 1). These objectives are not in conflict with the optimization of the analytical methods. Analytical parameters such as detection limits, reproducibility, sensitiv-

*Address correspondence to this author at the Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Complutense University of Madrid, Campus of Moncloa, 28040 Madrid, Spain; Fax: 003491 394 4329; E-mail: ccamara@quim.ucm.es

Equal contribution.

**Determinación de residuos farmacéuticos en
alimentos y muestras medioambientales.
Evaluación de su toxicidad con larvas de pez
zebra.**

Anexo C. Publicación científica



Method for quantifying NSAIDs and clofibric acid in aqueous samples, lumpfish (*Cyclopterus lumpus*) roe, and zebrafish (*Danio rerio*) eleutheroembryos and evaluation of their bioconcentration in zebrafish eleutheroembryos

N. Molina-Fernandez¹ · C. Perez-Conde¹ · S. Rainieri² · J. Sanz-Landaluze¹

Received: 15 January 2016 / Accepted: 10 April 2016
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

Abstract Pharmaceuticals such as nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and lipid regulators are being repeatedly detected at low concentrations ($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ – $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) in the environment. A large fraction of these compounds are ionizable. Ionized compounds show different physico-chemical properties and environmental behavior in comparison to their neutral analogs; as a consequence, the quantification methods currently available, based on the neutral molecules, might not be suitable to detect the corresponding ionized compounds. To overcome this problem, we developed a specific analytical method to quantify NSAIDs and lipid regulators (i.e., ibuprofen, diclofenac, naproxen, and clofibric acid) and their ionized compounds. This method is based on three steps: (1) the extraction of the organic compounds with an organic solvent assisted with an ultrasonic probe, (2) the cleaning of the extracts with a dispersive SPE with C_{18} , and (3) the determination of the chemical compounds by GC-MS (prior derivatization of the analytes). We demonstrated that the proposed method can successfully quantify the pharmaceuticals and their ionized compounds in aqueous samples, lumpfish eggs, and zebrafish

eleutheroembryos. Additionally, it allows the extraction and the cleanup of extracts from small samples (0.010 g of wet weight in pools of 20 larvae) and complex matrixes (due to high lipid content) and can be used as a basis for bioaccumulation assays performed with zebrafish eleutheroembryos in alternative to OECD test 305.

Keywords Zebrafish eleutheroembryos · Bioconcentration · NSAIDs · Clofibric acid · Cleanup · GC-MS

Introduction

NSAIDs together with lipid regulators are among the most commonly applied analgesics and anti-inflammatory drugs worldwide (Macia et al. 2007). Within those, ibuprofen (IBU), diclofenac (DC), naproxen (NP), and clofibric acid (CA) are some of the most frequently used. As a result of their widespread use, these products and their metabolites and products of degradation can enter the water supply from domestic or industrial waste water discharges, commercial food treatment procedures, and the ground application of manure, and in recent years, they are being detected at low concentrations levels (range of $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ or $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) in various environmental media such as surface water and sediments (Azzouz et al. 2010; Azzouz et al. 2015; Gentili et al. 2012; Arroyo et al. 2011; Dubreil-Chénéau et al. 2011; Grueiro Noche et al. 2011; Zhang H et al. 2013; Sadat Hasheeminasab et al. 2013; Coimbra et al. 2015; Corcoran et al. 2015).

There is evidence that NSAIDs and CA can induce ecotoxicological effects and bioaccumulation in aquatic organism (Corcoran et al. 2010). Coimbra et al. found a significant reduction in growth, a lower muscle triglyceride, impacts in male gonad development, and a decrease in the fecundity in adult zebrafish exposed at $10 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ as well as abnormalities

Responsible editor: Ester Heath

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s11356-016-6671-8) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ J. Sanz-Landaluze
jsanzlan@ucm.es

¹ Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical Science, Complutense University of Madrid, Avenida Complutense s/n, 28040 Madrid, Spain

² Food Research Division, AZTI, Parque Tecnológico de Bizkaia, Astondo Bidea 609, 48160 Derio, Spain

First published online: 11 May 2016



Determinación de residuos farmacéuticos en alimentos y muestras medioambientales. Evaluación de su toxicidad con larvas de pez zebra.

Anexo D. Aportaciones científicas derivadas de la presente Tesis Doctoral

Comunicaciones a Congresos:

- XV Reunión Nacional de la Sociedad Española de Química Analítica (2009). “Síntesis y Caracterización de Polímeros de Impresión Molecular para la Determinación de Ácido Clofíbrico”. N.Molina, E.E. Paniagua, C. Cacho, C. Pérez-Conde. Comunicación tipo póster.
- I Simposio de Jóvenes Investigadores en Espectroscopía Aplicada (2011). “Determinación de residuos farmacéuticos y fungicidas en muestras medioambientales y alimentarias mediante MIPs”. Noemí Molina Fernández, Concepción Pérez Conde. Comunicación oral.
- XXIII Reunión Nacional – VII Congreso Ibérico Espectroscopía (2012). “Larvas de pez cebra como organismo modelo para la evaluación de la bioconcentración de residuos farmacéuticos”. N. Molina, J. Sanz Landaluze, C. Pérez Conde, C. Cámara. Comunicación tipo póster.
- XVIII Reunión de la Sociedad Española de Química Analítica (2013). “Estudio de la bioacumulación de fármacos en larvas de pez cebra”. N. Molina, J. Sanz-Landaluce, C. Pérez-Conde, C. Cámara. Comunicación tipo póster.
- Orque Sudoe Summer School (2014). “Bioconcentration studies of pharmaceuticals in zebrafish larvae”. N. Molina, R. Gonzalo-Lumbreras, J. Sanz-Landaluce, C. Pérez-Conde, C. Cámara. Comunicación oral y tipo póster.
- 14^{as} Jornadas de Análisis Instrumental (2014). “Bioconcentration of pharmaceuticals using alternative method with zebrafish larvae as model organism”. N. Molina, R. Gonzalo-Lumbreras, J. Sanz-Landaluce, C. Pérez-Conde, C. Cámara Rica. Comunicación oral.

- XX Reunión de la Sociedad Española de Química Analítica (2015). “Biotransformation and bioaccumulation of antidepressants in zebrafish larvae by GC-MS and LC-MS/MS”. N. Molina-Fernández, J. Sanz-Landaluze, C. P. Conde, C. Cámara. Comunicación tipo póster.

- ICCE 2015 LEIPZIG. 15th EuCheMS International Conference on Chemistry and the Environment (2015). “Bioaccumulation and biotransformation of pharmaceuticals in zebrafish (*Danio rerio*) eleutheroembryos by GC-MS and LC-MS/MS”. N. Molina-Fernández, C. Pérez-Conde, S. Rainieri, C. Cámara, J. Sanz-Landaluze. Comunicación oral.

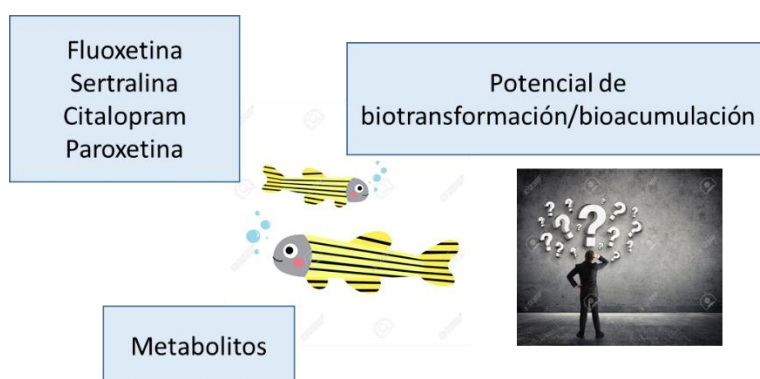
- I Simposio Anual en Química Avanzada (SAQA) (2016). “Estudio de la biotransformación y bioacumulación de antidepresivos (SSRI) en larvas de pez cebra mediante GC/MS y LC/MS”. N. Molina-Fernández. Comunicación oral.

Artículos derivados publicados o en preparación:

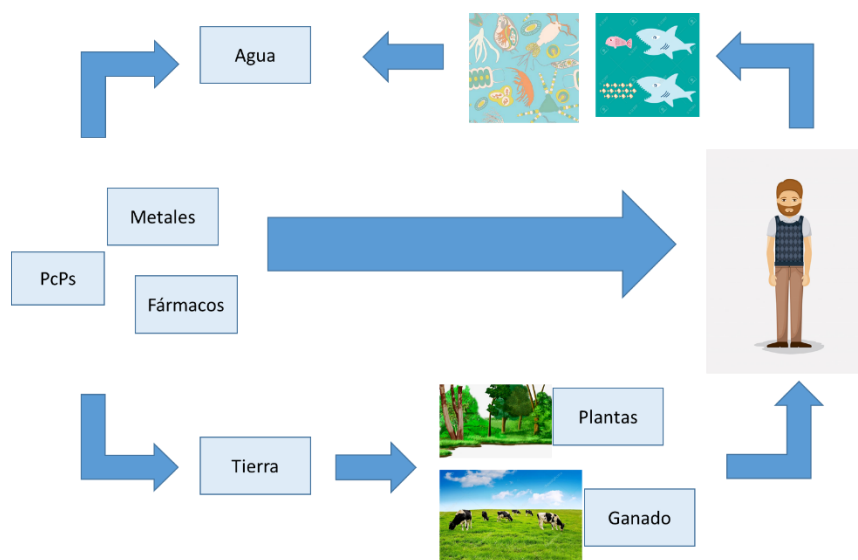
- N. Molina-Fernández, C. Pérez-Conde, S. Rainieri, J. Sanz-Landaluze. *“Method for quantifying NSAIDs and clofibric acid in aqueous samples, lumpfish (Cyclopterus lumpus) roe, and zebrafish (Danio rerio) eleutheroembryos and evaluation of their bioconcentration in zebrafish eleutheroembryos”*. Environmental Science and Pollution Research (2017) 24(12):10907-10918. DOI 10.1007/s11356-016-6671-8.



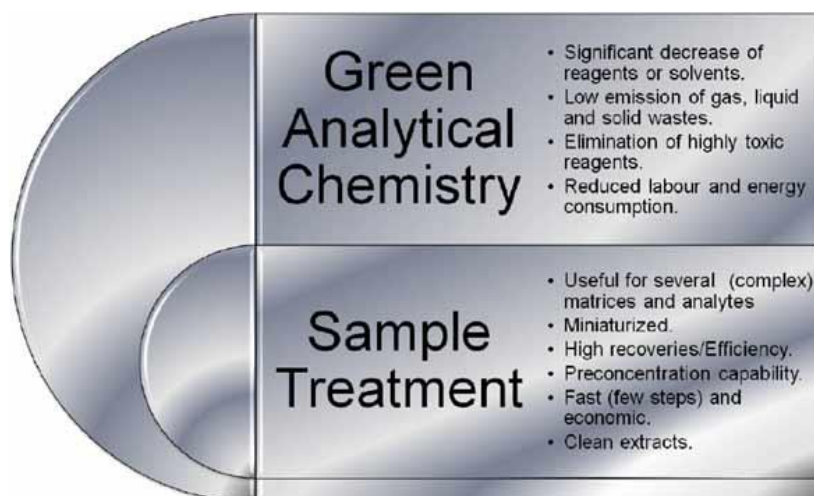
- N. Molina-Fernández, S. Rainieri, R. Muñoz-Olivas, C. Pérez-Conde, J. Sanz-Landaluze. *“Evidences of antidepressant drugs accumulation and metabolism in Danio Rerio eleutheroembryos”*. Artículo para enviar.



- N. Molina-Fernández, C. Pérez-Conde, J. Sanz-Landaluze. “Development of two miniaturized analytical methodologies for pharmaceutical compounds (Selective serotonin reuptake inhibitors, non-steroidal anti-inflammatory and lipid regulator) in fish samples”. Artículo en revisión.



- Noemí M. Fernández, Ana M. Coto-García, Raquel Gonzalo-Lumbreras, Jon Sanz-Landaluze, Concepción Pérez-Conde and Carmen Cámara. “Sample treatment in Organic Compound Determination: A Green Chemistry Perspective”. Current Green Chemistry (2016) 3(2): 133-144.
DOI : 10.2174/2213346103666160526130744.



La contaminación medioambiental es un tema recurrente de preocupación pública creciente debido a la elevada producción y/o consumo de compuestos que se vierten de manera descontrolada a los diferentes ecosistemas. Entre los contaminantes emergentes vertidos al medio acuático, se encuentran los residuos farmacéuticos. Esto ha conllevado a desarrollar nuevas metodologías analíticas para su identificación y determinación en concentraciones a nivel de trazas ($\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ – $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$). Por ello, la presente Tesis Doctoral se centra en el desarrollo de metodologías analíticas centradas en la determinación de tres familias de fármacos de elevado consumo humano y veterinario: antiinflamatorios no esteroides (NSAIDs), reguladores lipídicos y antidepresivos inhibidores de la recaptación de serotonina (SSRIs) y metabolitos para su posterior aplicación al estudio del potencial de bioacumulación en larvas de pez cebra así como en matrices alimentarias de pescado de consumo y productos manufacturados derivados del mismo.

“Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado. Un esfuerzo total, es una victoria completa”.

Mahatma Gandhi